

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Paulína Božíková**

Studie mechanismu tvorby fibrinové sítě  
Study of mechanism of fibrin network formation

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Markéta Martínková, PhD.

Školitel: Ing. Tomáš Riedel, PhD.

Praha 2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Ing. Tomášem Riedelem, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

V Praze 24.8.2012

.....

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Ing. Tomáši Riedlovi, PhD. a vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Markétě Martínkové, PhD. za veškerou pomoc při zpracování bakalářské práce a značnou ochotu pomoci při všech problémech, které se v průběhu psaní práce vyskytly.

## **Abstrakt**

Serinová proteasa trombin hraje důležitou roli v procesu vzniku fibrinové sítě, kdy katalytickým účinkem přeměňuje molekuly fibrinogenu na fibrin monomer, který spontánně polymeruje za vzniku fibrinové sítě. Cílem této práce byla charakterizace interakcí mezi trombinem a povrchově vázaným fibrin(ogen)em nebo fibrinovou sítí, na které se trombin může vázat a tím podpořit nárůst sítě. Aktivita trombinu navázaného na fibrin nebo fibrinovou síť byla určena spektrofotometricky v závislosti na množství štěpeného chromogenního substrátu. S využitím metody resonance povrchových plasmonů byl pozorován vznik fibrinové sítě iniciovaný trombinem vázaným na fibrinogen nebo fibrin. Takto vzniklé sítě byly zobrazeny mikroskopem atomárních sil. Afinitní konstanta  $K_D$  určena pro interakci fibrinogenu v roztoku s fibrinovou sítí připravenou na povrchu je ve shodě s dřívějším experimentem, ve kterém byla  $K_D$  stanovena z interakce fibrinogenu, kovalentně vázaného na povrch, s monomery fibrinu v roztoku.

**Klíčová slova:** trombin, fibrinogen, fibrinová síť

## **Abstract**

Serine protease thrombin plays an important role in the process of fibrin network formation by converting fibrinogen into fibrin monomer which spontaneously polymerizes to form fibrin network. The aim of this work was to characterize interactions between thrombin and surface adsorbed fibrin(ogen) or fibrin network to which thrombin can bind and initiate grow of the fibrin network. Activity of thrombin bound on fibrinogen or fibrin was determined spectrophotometrically in a relation to cleaved chromogenic substrate. Using the method of surface plasmon resonance fibrin network formation initiated by thrombin bound to fibrinogen or fibrin was observed. These networks were also visualized by atomic force microscopy. Determined value of affinity constant  $K_D$  for interaction of fibrinogen in solution with a fibrin network prepared on surface is in agreement with previous experiments in which  $K_D$  was determined from interaction of surface covalently bound fibrinogen with fibrin monomers in solution.

**Key words:** thrombin, fibrinogen, fibrin network

(In Czech)

# Obsah

1	Úvod	9
1.1	Hemostasa	9
1.2	Fibrinogen a jeho struktura	9
1.2.1	Řetězce	9
1.2.2	Regiony, domény a dvojité svinutá oblast	10
1.2.3	Řetězec $\gamma'$	11
1.3	Trombin	11
1.4	Od fibrinogenu k fibrinové síti	12
1.4.1	Fibrinopeptidy a vznik fibrinové sítě	12
1.4.2	Interakce fibrinogenu s fibrinem a fibrinovou sítí	14
1.4.3	Adsorpce fibrinogenu na povrch	14
1.4.4	Odštěpování fibrinopeptidů z fibrinogenu na povrchu	15
1.5	Další procesy, kterých se fibrinogen a fibrinová síť účastní	16
2	Cíle práce	17
3	Materiál a metody	18
3.1	Použitý materiál a chemikálie	18
3.2	Metody	19
3.2.1	Příprava mikroskopických sklíček	19
3.2.2	Příprava tenké fibrinové sítě růstem u povrchu	19
3.2.3	Měření aktivity povrchově vázaného trombinu na fibrin(ogen)u	19
3.2.4	Měření uvolňování trombinu z fibrin(ogen)ové vrstvy	20
3.2.5	Měření uvolňování trombinu z fibrin(ogen)ové vrstvy vlivem roztoku fibrinogenu	20
3.2.6	Inhibice povrchově vázaného trombinu pomocí PPACK a hirudinu	21
3.2.7	SPR - měření	21
3.2.8	Detekce fibrinogenu v depositu plasmy a séra	22
3.2.9	Interakce depositu plasmy s trombinem a fibrinogenem	22

3.2.10	Vliv heparinu na růst fibrinové sítě z depositu plasmy	23
3.2.11	Kinetika interakce Fbg s fibrinovou sítí	24
4	Výsledky a diskuze	25
4.1	Měření aktivity povrchově vázaného trombinu	25
4.1.1	Množství navázaného trombinu na fibrin(ogen)ové vrstvě s časem	25
4.1.2	Měření uvolňování trombinu z Fbg/Fb vrstvy	26
4.1.3	Měření uvolňování trombinu z Fbg/Fb vrstvy vlivem roztoku fibrinogenu	27
4.1	Inhibice povrchově vázaného trombinu pomocí PPACK a hirudinu	29
4.2	Vliv antitrombinu III na růst povrchové fibrinové sítě	31
4.3	Vliv antitrombinu III s heparinem na růst povrchové fibrinové sítě	33
4.4	SPR měření	35
4.4.1	Detekce fibrinogenu v depositu plasmy a séra	35
4.4.2	Interakce depositu plasmy s trombinem a fibrinogenem	37
4.4.3	Vliv heparinu na růst fibrinové sítě z depositu plasmy	38
4.5	Kinetika interakce Fbg s fibrinovou sítí	40
5	Závěr	43
	Seznam použité literatury:	44

## Seznam použitých zkratk a symbolů

aFbg	polyklonální protilátka proti fibrinogenu
AFM	mikroskop atomárních sil (Atomic Force Microscope)
ATIII	antitrombin III
Fb	fibrin
Fbg	fibrinogen
Fbg/Fb vrstva	fibrin(ogen)ová vrstva
$K_D$	afinitní konstanta
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PPACK	D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginine Chloromethylketone
Q voda	deionizovaná voda
SPR metoda	metoda resonance povrchových plasmonů (Surface Plasmon Resonance)
Thr	trombin



# 1 Úvod

## 1.1 Hemostasa

Hemostasa je důležitý proces, který zabezpečuje zástavu krvácení v případě poranění cévy. Vyžaduje koordinovanou spolupráci krevních deštiček, koagulačních faktorů, endoteliálních buněk a svaloviny cév. Součástí tohoto procesu je vazokonstrikce, tvoření primární zátky z krevních deštiček, které mohou přilnout jednak na poškozený endotel, případně na cizí materiál. Dále sem patří tvorba fibrinové sítě, která zpevňuje primární zátku, čímž vzniká stabilní sekundární zátky. V neposlední řadě je součástí hemostasy také degradace vzniklé zátky.

Tvorba fibrinové sítě je výsledkem sledu enzymatických reakcí, označovaných jako koagulační kaskáda, které jsou iniciovány poraněním cévy nebo stykem krve s cizím předmětem. Koagulační kaskáda vede ke vzniku trombinu, který spolu s fibrinogenem patří mezi proteiny krevní plasmy, které jsou přímo spojeny se vznikem fibrinové sítě, čímž se významně podílí na zástavě krvácení. Jsou také spojovány s poruchami koagulace krve vedoucí ke vzniku trombů, čímž ohrožují průchodnost cév [1].

## 1.2 Fibrinogen a jeho struktura

Fibrinogen je rozpustný fibrilární glykoprotein s molekulovou hmotností 340 kDa [2] a délkou 45 nm [3]. V krevní plasmě se fibrinogen přirozeně vyskytuje v koncentraci kolem 2,0 – 4,0 g/l [4].

### 1.2.1 Řetězce

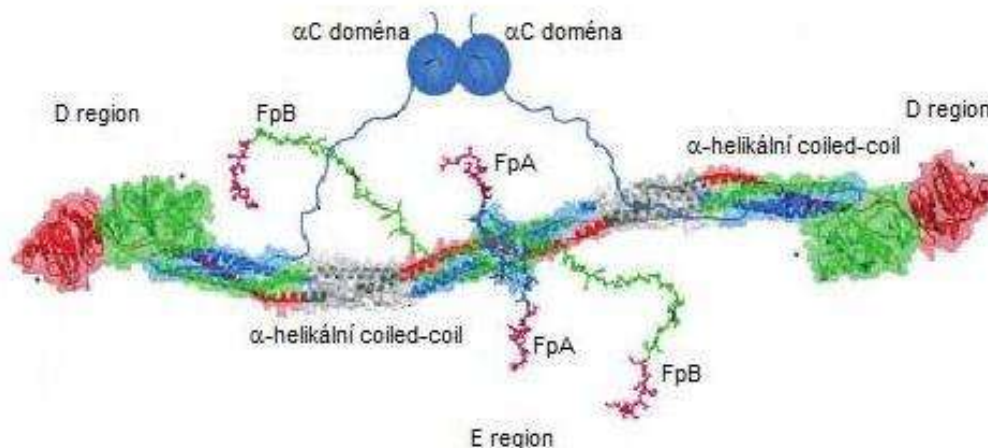
Molekula fibrinogenu je tvořena dvěma identickými podjednotkami [5], z kterých každá je tvořena třemi rozdílnými polypeptidovými řetězci, které jsou označovány jako A $\alpha$ , B $\beta$  a  $\gamma$  [6]. Řetězec A $\alpha$  je tvořen 610 aminokyselinovými zbytky, řetězec B $\beta$  461 a řetězec  $\gamma$  je tvořen 411 aminokyselinovými zbytky [7]. Molekulová hmotnost je přibližně 66,5 kDa pro A $\alpha$  řetězec, 52 kDa pro B $\beta$  řetězec a 46,5 kDa pro  $\gamma$  řetězec [3]. Všechny šest řetězců molekuly je spojeno celkem 29 intra a inter disulfidovými vazbami, přičemž řetězec A $\alpha$  obsahuje 8, řetězec B $\beta$  11 a řetězec  $\gamma$  10 cysteinových zbytků [7].

### 1.2.2 Regiony, domény a dvojité svinutá oblast

Molekula fibrinogenu obsahuje tři globulární oblasti, které jsou pozorovatelné v elektronovém mikroskopu. Dvě se nacházejí symetricky na obou koncích molekuly a jsou označovány jako D regiony. Tuto oblast tvoří C-koncové oblasti řetězců B $\beta$  a  $\gamma$  ( $\beta$ C doména,  $\gamma$ C doména) [8]. Tato oblast je důležitá pro polymeraci fibrinu a jeho stabilizaci. Navíc se v této oblasti může také vázat trombin na fibrinogen [9]. Třetí globulární oblast tvoří centrální část molekuly, označovaná jako E region. Tato oblast je tvořena N-koncovými částmi všech šesti řetězců tvořících molekulu. Řetězce jsou v této oblasti spojeny třemi disulfidovými vazbami [10].

C-koncová oblast řetězce A $\alpha$ , která je označována jako  $\alpha$ C doména, vede z koncového D regionu zpět k E regionu, kde interaguje jednak s tímto regionem, ale také s  $\alpha$ C doménou druhého A $\alpha$  řetězce téže molekuly [11].

Centrální E region je s koncovými D regiony spojen  $\alpha$ -helikální dvojité svinutou strukturou zvanou coiled-coil [12]. Struktura molekuly je zobrazena na obr. 1.



**Obr 1. Molekula fibrinogenu.** (upraveno podle [13])

Je tvořena dvěma identickými podjednotkami, z nichž každá je tvořena třemi řetězci A $\alpha$ , B $\beta$  a  $\gamma$ , spojenými uprostřed molekuly, kde se nacházejí jejich N-koncové části. Řetězce zobrazeny barevnými proužky. D regiony jsou koncové globulární oblasti a E region je centrální globulární oblast molekuly. Jsou spojeny  $\alpha$ -helikální strukturou označovanou „coiled-coil“. FpA a FpB jsou krátké peptidy nazývané fibrinopeptidy. Nacházejí se v E regionu molekuly jako N-koncové části řetězců A $\alpha$  a B $\beta$ .  $\alpha$ C domény jsou C-koncové oblasti řetězců A $\alpha$ , které navzájem interagují.

### 1.2.3 Řetězec $\gamma'$

Alternativním sestřihem mRNA jsou v plasmě fyziologicky přítomny dva druhy fibrinogenu lišící se v  $\gamma$  řetězci [14]. Řetězce A $\alpha$  a B $\beta$  jsou pro oba typy fibrinogenu stejné. Fibrinogen, který obsahuje variantu řetězce  $\gamma$  označovanou jako  $\gamma'$  [15] v isoformě  $\gamma/\gamma'$ , tvoří 15 % celkového množství fibrinogenu v plasmě [16]. Homodimerické molekuly  $\gamma'/\gamma'$  tvoří méně než 1 % celkového fibrinogenu v krvi [17].

Varianta  $\gamma'$  je více negativně nabitá než řetězec  $\gamma$  [15] bez této varianty a je také delší o 16 aminokyselinových zbytků. Tento rozdíl mezi řetězci  $\gamma$  a  $\gamma'$  odpovídá molekulové hmotnosti přibližně 2000Da [17].

Řetězec  $\gamma'$  má v procesu srážení krve důležitou úlohu, jelikož se na něj může vázat trombin prostřednictvím vazebného místa (exosite II) [9, 18]. Takto navázaný trombin je chráněn před vlivem tzv. nepřímých inhibitorů, kterým je například přirozený inhibitor přítomný v procesu koagulace, antitrombin III [19]. Fibrinogen obsahující řetězec  $\gamma'$  je proto spojen se zvýšeným rizikem trombózy.

## 1.3 Trombin

Trombin (EC 3.4.21.5), faktor IIa koagulační kaskády s molekulovou hmotností 34kDa, vzniká proteolytickou proměnou zymogenu protrombinu, faktoru II koagulační kaskády, účinkem faktoru Xa v přítomnosti faktoru Va, fosfolipidů a vápenatých iontů [20]. Je důležitou serinovou proteinasou, která katalyzuje proteolytickou proměnu fibrinogenu na fibrin [21]. Je proto důležitou součástí koagulace, kde tvorbou fibrinu a následně fibrinových vláken, ze kterých je tvořena fibrinová síť, významně napomáhá tvorbě krevní zátky, která je nezbytná pro zástavu krvácení. Obsahuje dvě pozitivně nabitá vazebná místa nacházející se na opačných koncích molekuly (anion-binding exosite I a II). Vazebné místo I (exosite I) váže fibrinogen, ale také hirudin. Vazebné místo II (exosite II) váže heparin, který zvyšuje rychlost účinku přirozeného inhibitoru antitrombinu III [22].

Jak již bylo zmíněno, trombin, který je navázaný na fibrin(ogen), nemůže být inaktivován antitrombinem III, může být ovšem inaktivován na antitrombinu III nezávislými inhibitory, jakými jsou například hirudin nebo D-fenylalanyl-L-prolyl-L-arginin-chloromethylketon (PPACK) [19].

Trombin má také další prokoagulační vlastnosti. Aktivuje transglutaminasový faktor XIII, který pak napomáhá sesíťování fibrinových vláken. Prostřednictvím aktivace faktorů XI,

VIII a V také podporuje tvorbu dalšího trombinu z protrombinu [1].

## 1.4 Od fibrinogenu k fibrinové síti

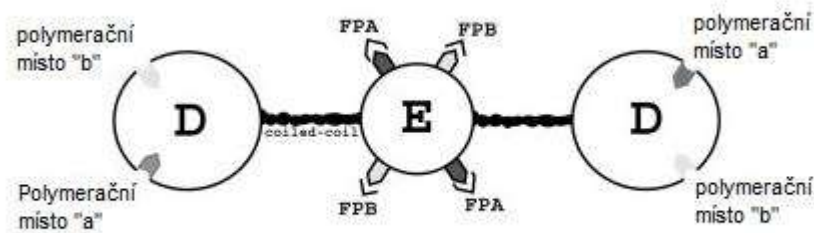
### 1.4.1 Fibrinopeptidy a vznik fibrinové sítě

Vznik fibrinové sítě z fibrinogenu je nezbytný v procesu koagulace, a tedy je esenciální pro zabránění nadměrným ztrátám krve z poškozené cévy.

Jak již bylo zmíněno, molekula fibrinogenu obsahuje tři globulární oblasti, dvě koncové D a jednu E, která se nachází uprostřed molekuly. V této centrální E oblasti se nacházejí N-koncové části šesti řetězců molekuly,  $A\alpha$ ,  $B\beta$  a  $\gamma$  [8]. Pro vznik fibrinové sítě jsou důležité právě krátké peptidy N-koncové části řetězců  $A\alpha$  a  $B\beta$ , konkrétně úseky řetězců  $A\alpha$  tvořeny 16 aminokyselinovými zbytky, označované jako fibrinopeptidy A a úseky řetězců  $B\beta$  tvořeny 14 aminokyselinovými zbytky, které jsou označovány jako fibrinopeptidy B [21]. Fibrinopeptidy A i B mají záporný náboj a podílejí se na bránění samovolné polymerace molekul fibrinogenu [23].

Po poranění cévy, nebo styku krve s cizím povrchem se aktivuje koagulační kaskáda, výsledkem které vzniká trombin, který je serinovou proteasou [1].

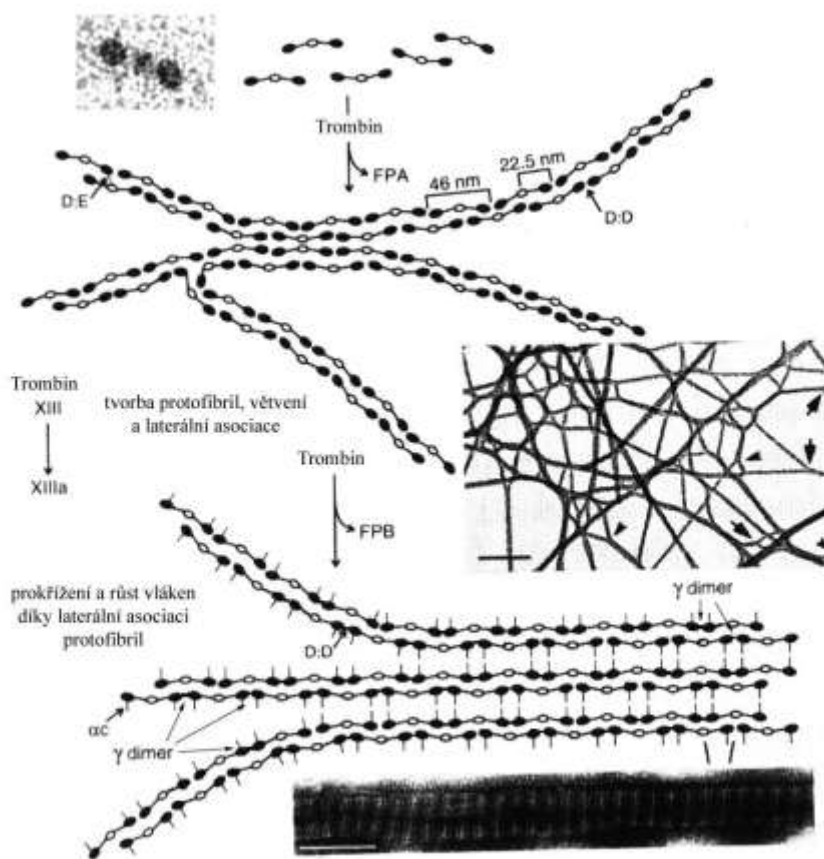
Proteolytickým účinkem trombinu jsou z centrální E oblasti molekuly fibrinogenu odštěpovány fibrinopeptidy A a B [21]. Po odštěpení fibrinopeptidů jsou odhaleny kladně nabitá polymerační místa. Tato polymerační místa „A“ a „B“ jsou komplementární k polymeračním místům „a“ a „b“, které se nacházejí v D regionu další molekuly fibrinogenu, viz. obr. 2. Tato místa jsou na rozdíl od polymeračních míst „A“ a „B“ přístupná pořád [24].



**Obr. 2: Schematické znázornění molekuly fibrinogenu.** Převzato z [25]

Molekula fibrinogenu obsahuje v globulárním D regionu molekuly neustále přístupné polymerační místa „a“ a „b“. V E regionu přítomné fibrinopeptidy (FpA, FpB) jsou katalytickým účinkem trombinu odštěpovány, čímž se odhalí polymerační místa „A“ a „B“

Z experimentů založených na smíchání roztoků trombinu a fibrinogenu bylo zjištěno, že působením trombinu nejprve dochází k odštěpení fibrinopeptidů A a po krátké lag-fázi dochází k odštěpení také fibrinopeptidů B [26]. Odštěpením fibrinopeptidů z molekuly fibrinogenu vzniká monomer fibrinu. Jeho polymerační místa „A“ a „B“ se vážou elektrostaticky s komplementárními polymeračními místy „a“ a „b“ jiné molekuly fibrinogenu nebo dalšího monomeru fibrinu [24]. Tímto způsobem vznikají dvouvláknové protofibrily, ve kterých vždy E region jednoho monomeru fibrinu je spojen s D regiony dalších dvou monomerů fibrinu. Vše je znázorněno na obr. 3. Následným laterálním spojením protofibril vznikají fibrinová vlákna, ze kterých vzniká trojrozměrná fibrinová síť. Za vznik dvouvláknových protofibril v tomto procesu jsou odpovědny zejména interakce „A“-„a“, za agregaci protofibril pak zejména interakce „B“-„b“ [27].



**Obr. 3: Schéma polymerizace fibrinu.** Převzato z [28]

Tato schéma zobrazuje vznik dvouvláknových protofibril po trombinem katalyzovaném odštěpení fibrinopeptidů A (nahore), v dalším kroku pak laterální asociaci protofibril po odštěpení fibrinopeptidů B a vznik fibrinové sítě (dole), které je ve finálním kroku stabilizovaná prokřížením D regionů faktorem XIIIa. Model je doplněn transmisními elektronovými mikrofotografy molekuly fibrinogenu (nahore), fibrinovou sítí (uprostřed) a fibrinovým vláknem (dole).

S globulárními regiony molekuly Fbg, zmíněnými v odstavci 1.2.2, je spojeno pozorování tzv. žebrování fibrinových vláken (angl. band pattern). Fibrinová vlákna mají charakteristický vzor opakujících se pruhů, které jsou od sebe vzdáleny 22,5 nm, což odpovídá polovině délky celé molekuly Fbg. Tyto pruhy byly objeveny negativně kontrastním barvením fibrinových vláken, zobrazeny transmisním elektronovým mikroskopem, a mají spojitost s proteinovou hustotou Fbg a Fb. Místa s vyšší proteinovou hustotou, která odpovídají D a E oblastem molekul fibrinogenu, které jsou spojeny s E a D oblastmi dalších molekul fibrinu, se jeví jako světlé pruhy, protože nepropustí barvivo, zatím co místa s nízkou proteinovou hustotou, které odpovídají oblastem  $\alpha$ -helikální dvojité vinuté struktury („coiled-coil“), umožní proniknout většímu množství barvy, což se projeví tmavými pruhy [29, 30].

Účinkem transglutaminasy (faktor XIIIa koagulační kaskády) jsou kovalentně propojeny specifické glutaminové zbytky jedné molekuly fibrinu s lysinovými zbytky jiné molekuly, čímž je síť stabilizována vůči mechanickému a proteolytickému poškození. Vzniká nerozpustná fibrinová síť [3].

#### **1.4.2 Interakce fibrinogenu s fibrinem a fibrinovou sítí**

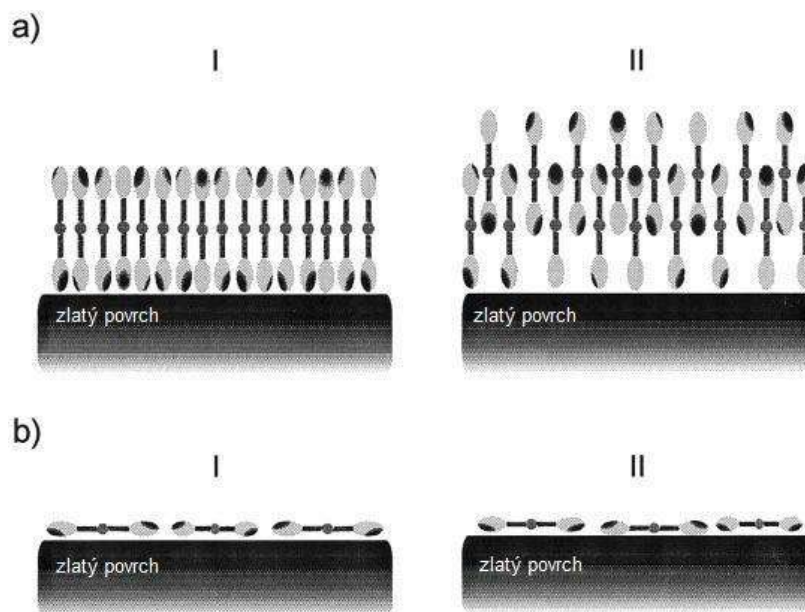
Jak již bylo zmíněno dříve, katalytickým odštěpením fibrinopeptidů A a B z E regionu molekul fibrinogenu vznikají monomery fibrinu, které se následně spojují v dimery, a následně vzniká fibrinová síť. Pro charakterizaci síly interakcí mezi monomery fibrinu a fibrinogenem byla v různých pokusech určena afinitní konstanta  $K_D$ , konkrétně  $\sim 10^{-8}$  M pro interakci monomerů fibrinu s fibrin(ogen)em kovalentně vázaným na povrch [25]. V této práci pak byla afinitní konstanta určena pro interakci fibrinogenu z roztoku, s trombinem aktivovanou fibrinovou sítí připravenou na povrchu čipu. Pro určení této konstanty byla využita metoda resonance povrchových plasmonů.

#### **1.4.3 Adsorpce fibrinogenu na povrch**

Pro zkoumání vzniku fibrinové sítě bylo provedeno mnoho pokusů. Tyto pokusy byly založeny na přidání trombinu do roztoku fibrinogenu [3, 31]. Fyziologicky ovšem proces srážení se vznikem fibrinové sítě neprobíhá volně v krvi, ale je vždy iniciován na povrchu, např. poraněné cévy nebo cizím materiálu. Proto je důležité studovat vznik fibrinové sítě od povrchu.



Jako jeden z prvních procesů po styku krve s povrchem jiným než je neporušená cévní stěna je pozorována adsorpce krevních proteinů na tento povrch [32]. Při pozorování adsorpce fibrinogenu z roztoku na povrch bylo zjištěno, že množství fibrinogenu, který se naváže na tento povrch je závislé na koncentraci fibrinogenu v roztoku, z kterého se na povrch váže. Fibrinogen může být, v závislosti na jeho koncentraci v roztoku, vázán na povrch dvěma různými způsoby. Z nízké koncentrace (do 20 $\mu$ g/ml) se váže způsobem, jako by celou délkou ležel na povrchu (angl. „side-on“), z vyšší koncentrace (nad 100 $\mu$ g/ml) pak, jako by na povrchu stál jedním koncem molekuly (angl. „end-on“) a v tomto druhém případě se ho na povrch může adsorbovat více [33]. Možné uspořádání molekul fibrinogenu na povrchu znázorňuje obr. 4. Na povrchu se v obou případech vytváří monovrstva fibrinogenu, na kterou se již, po přidání dalšího roztoku fibrinogenu, žádný fibrinogen neváže [33].



**Obr. 4: Fibrinogen adsorbovaný na povrchu.** Převzato z [33]

Schéma znázorňující různé uspořádání molekul fibrinogenu adsorbovaných na zlatém povrchu a) z vysoké koncentrace (v uspořádání end-on), b) z nízké koncentrace (v uspořádání side-on)

#### 1.4.4 Odštěpování fibrinopeptidů z fibrinogenu na povrchu

Povrchově vázaný fibrinogen může být trombinem (katalyticky) přeměňován na fibrin [21]. Odštěpování fibrinopeptidů z centrální E oblasti ovšem probíhá v případě povrchově vázaného fibrinogenu jinak, než je tomu u fibrinogenu v roztoku. Důvodem jsou konformační změny v molekule fibrinogenu, ke kterým dochází při adsorpci fibrinogenu na povrch [34].

V případě fibrinogenu adsorbovaného na povrch jsou v přítomnosti trombinu fibrinopeptidy B odštěpovány bez opoždění, které je pozorovatelné, když fibrinová síť vzniká v roztoku, což se vysvětluje právě konformačními změnami, které jsou v případě vzniku sítě v roztoku spojeny s odštěpením FpA a vznikem protofibril [34].

Odštěpování fibrinopeptidů závisí také na orientaci molekul fibrinogenu adsorbovaných na povrchu. V případě adsorbování z nižší koncentrace a navázání v poloze („side-on“), je iniciační rychlost odštěpování FpA rychlejší než iniciační rychlost odštěpování FpB, přičemž ale výsledná koncentrace odštěpených FpA i FpB je stejná. V případě molekul uspořádaných v poloze („end-on“) a také v případě sekundární vrstvy fibrinogenu, navázaného na trombinem aktivovanou Fbg/Fb monovrstvu, je pak množství odštěpených FpA výrazně nižší než množství odštěpených FpB. Jako jedno z vysvětlení se předpokládá horší přístupnost FpA pro trombin. FpB jsou mnohem flexibilnější než FpA, a tedy pro trombin dostupnější [34].

## **1.5 Další procesy, kterých se fibrinogen a fibrinová síť účastní**

Důležitost fibrinogenu v krvi není omezena jenom na vznik fibrinové sítě v případě poranění cévy. Kromě tvoření fibrinové sítě také v procesu zástavy krvácení - vytváří můstky mezi krevními deštičkami, které adherují v místě poranění na subendoteliální povrch a následně agregují. Tímto procesem vzniká tzv. primární zátka [1]. Fibrinogen se váže na krevní deštičky přes integrinové receptory, které se nacházejí na jejich povrchu, a každá molekula fibrinogenu se na tyto receptory může s vysokou afinitou vázat svými koncovými oblastmi [35]. Fibrinogen také podporuje aktivaci a agregaci krevních deštiček v místě poranění a je esenciální v průběhu zánětu.

Fibrinová vlákna, která pak vznikají v procesu koagulace, zpevňují primární zátku, ale také interagují s různými typy buněk, čímž se významně podílí také na hojení poranění. Po vytvoření definitivní zátky se fibrinová síť stává jakousi kostrou pro navázání buněk endotelu a hladkých svalových buněk a přímo se tak účastní obnovy stěny poškozených cév, angiogenesy [36]. Z tohoto důvodu se fibrinová síť také používá jako matrice pro přípravu umělých tkání v tkáňovém inženýrství [37].



## **2 Cíle práce**

Cílem práce byla charakterizace interakcí trombinu s fibrin(ogen)ovou vrstvou případně s fibrinovou sítí - adsorpce trombinu na zmíněné materiály a stability interakce trombinu s povrchem Fbg a Fb sítě v prostředí různých roztoků. Dále zobrazení a popis sítí vzniknutých katalytickým účinkem povrchově vázaného trombinu na fibrinogen v roztoku pomocí AFM. Dalším cílem bylo pozorování dějů probíhajících na povrchu zlatého čipu metodou resonance povrchových plasmonů. Specificky se jedná o adsorpci fibrinogenu z depositu plasmy, interakci trombinu a fibrinogenu s adsorbovanou monovrstvou fibrinogenu a vznik sítě iniciované účinkem povrchově vázaným trombinem. Posledním cílem bylo určení afinitní konstanty pro interakci fibrinogenu v roztoku s fibrinovou sítí připravenou na povrchu

### **3 Materiál a metody**

#### **3.1 Použitý materiál a chemikálie**

Sigma Aldrich (Německo):

Fibrinogen, trombin, gutaraldehyd, chromogenní substrát S-2238, PBS

Lach-ner (Česká Republika):

Kyselina sírová, peroxid vodíku, kyselina octová, chlorid sodný, chlorid vápenatý

Calbiochem (USA):

Heparin, hirudin, fenylalanyl-L-prolyl-L-arginin-chlormetyl keton (PPACK)

Chromogenix (Itálie):

Antitrombin III

Citrátová plasma byla získána od zdravých dárců na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze (Česká Republika).

K přípravě roztoků byly použity následující pufrы:

0,05M Tris pufr pH 7,4 obsahující 0,1M NaCl a 2,5mM CaCl<sub>2</sub>

0,1M fosfátový pufr, pH 7,4 (PBS)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Příprava mikroskopických sklíček**

Mikroskopická sklíčka byla opláchnuta Q-vodou, následně se v stojanu na sklíčka na půl hodiny ponechala v kádince s roztokem kyseliny sírové (96%) a peroxidu vodíku (30%) v poměru 2:1. Po uvedené době byly několikrát propláchnuty Q-vodou a následně usušeny v laminárním boxu.

### **3.2.2 Příprava tenké fibrinové sítě růstem u povrchu**

Metoda je založena na postupné inkubaci povrchu s roztoky reagentů. Mezi aplikacemi roztoků byl povrch vždy důkladně opláchnut Tris pufrům. Nejprve se adsorboval fibrinogen na povrch substrátu (v této práci zejména na mikroskopické sklíčko, polystyren a zlato) z Tris pufru s koncentrací fibrinogenu 5 µg/ml po dobu 90 min. Následně byl povrch 15 min inkubován s roztokem trombinu (o aktivitě 2,5 U/ml). V tomto kroku trombin přeměnil část adsorbovaného fibrinogenu na fibrin. Opláchnutím povrchu pomocí Tris pufru došlo k vypláchnutí nenavázaného trombinu. V posledním kroku se pak k povrchu s pevně navázaným trombinem přidal roztok fibrinogenu o koncentraci 200 µg/ml s antitrombinem III 0,1-0,75 U/ml a případně také s heparinem 0,1 - 100 µg/ml. Nakonec byly vzorky převedeny do PBS a zafixovány přes noc 1% roztokem glutaraldehydu. Druhý den byla sklíčka s připravenou fibrinovou sítí usušena lyofilizací. Morfologie a tloušťka fibrinových sítí byla pozorována po vysušení pomocí AFM v tapping módu.

### **3.2.3 Měření aktivity povrchově vázaného trombinu na fibrin(ogen)u**

Množství povrchově vázaného trombinu bylo měřeno pomocí chromogenního substrátu S-2238. Působením 300 µl roztoku fibrinogenu (20 µg/ml) po dobu 120 minut byla vytvořena fibrinogenová monovrstva na povrchu šesti jamek polystyrénové titrační deštičky. Poté byly jamky 5krát promyty 300 µl Tris pufru, čímž se vymyl Fbg, který nezůstal přichycen na povrchu jamek. V dalším kroku se do dvou jamek, které sloužily jako „blank“, pipetoval roztok chromogenního substrátu (300 µl, 0,1 mmol/l). Do ostatních jamek bylo pipetováno 300 µl roztoku trombinu (2,5 U/ml). Roztok trombinu se nechal v jamkách působit po dobu 5, 15, 30, 60 a 90 minut. Po stanovené době působení roztoku trombinu byly jamky 5krát promyty 300 µl Tris pufru, pro vymytí trombinu, který se po stanovenou dobu nenavázal

na Fbg/Fb vrstvu. Okamžitě poté bylo do jamek pipetováno 300  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu (0,1 mmol/l). Po 90 minutách od pipetování roztoku chromogenního substrátu do jamek byla reakce, která představuje přeměnu chromogenního substrátu na barevný produkt působením trombinu, zastavena přidáním 100  $\mu$ l 30% kyseliny octové. Aktivita trombinu byla měřena pomocí UV-VIS spektrometrie při vlnové délce 405 nm.

#### **3.2.4 Měření uvolňování trombinu z fibrin(ogen)ové vrstvy**

Na dně polystyrenových jamek titrační deštičky byla vytvořena fibrinogenová monovrstva působením roztoku fibrinogenu (5  $\mu$ g/ml) po dobu 90 min. Na tuhle vrstvu se nechal navázat trombin z roztoku (2,5 U/ml, po dobu 15 min). Po promytí se v polystyrenových jamkách nechal na 15, 30, 45, 60 a 90 minut Tris pufr, který se po uplynutí uvedené doby vyměnil za roztok chromogenního substrátu (0,1 mmol/l). Množství přítomného trombinu, které nebylo uvolněno z fibrin(ogen)ové vrstvy působením Tris pufru se dokazovalo spektrofotometricky při vlnové délce 405nm.

#### **3.2.5 Měření uvolňování trombinu z fibrin(ogen)ové vrstvy vlivem roztoku fibrinogenu**

Tenká povrchová fibrinová síť byla připravena v šesti jamkách polystyrenové titrační deštičky dle postupu uvedeného v kap. 3.2.2. Ve druhém kroku byl roztok fibrinogenu obohacen antitrombinem III (0,5U/ml) a heparinem (60 $\mu$ g/ml) a přidán do jamek 2-6. Do první jamky bylo po odsátí Tris pufru pipetováno 300  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu S-2238 (0,1mM). V ostatních jamkách se ponechal roztok Fbg, ATIII s heparinem po dobu 15, 30, 45, 60 a 90 minut. Po uplynutí této doby byly jamky 5krát promyty Tris pufrům. Okamžitě po odsátí Tris pufru bylo do každé jamky pipetováno 300  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu S-2238 (0,1mM). Po 90 minutách od přidání roztoku chromogenního substrátu bylo do každé ze šesti jamek přidáno 100  $\mu$ l 30% kyseliny octové. Nakonec byla změřena aktivita trombinu v jamkách při vlnové délce 405 nm.

### 3.2.6 Inhibice povrchově vázaného trombinu pomocí PPACK a hirudinu

Do 12 jamek polystyrenové titrační destičky bylo pipetováno 500  $\mu$ l roztoku fibrinogenu (5  $\mu$ g/ml) a tento se nechal působit po dobu 90 minut. Následně byly jamky 5krát promyty Tris pufrém. V dalším kroku se nechalo v šesti jamách působit 200  $\mu$ l roztoku trombinu (2,5 U/ml) po dobu 15 minut. Tyto jamky byly poté opět 5krát promyty 500  $\mu$ l Tris pufru. Na takto připravenou fibrin(ogen)ovou monovrstvu s navázaným trombinem se po dobu 90 minut nechalo působit 300  $\mu$ l roztoku Fbg (200  $\mu$ g/ml), ATIII (0,5 U/ml) s heparinem (60  $\mu$ g/ml). Nakonec byly jamky opět promyty 500  $\mu$ l Tris pufru.

Do všech jamek bylo následně na 15 minut přidáno 200  $\mu$ l roztoku trombinu (2,5 U/ml). Poté byly opět všechny jamky 5krát promyty Tris pufrém.

V dalším kroku byl Tris pufr ve dvou jamkách (v jedné, která obsahovala fibrin(ogen)ovou vrstvu a v druhé obsahující fibrinovou síť) vyměněn 300  $\mu$ l chromogenního substrátu (S-2238) (0,1 mmol/l).

Do tří jamek z každé série (fibrin(ogen)ová vrstva, fibrinová síť) bylo pipetováno 300  $\mu$ l roztoku PPACK (10  $\mu$ mol/l) na dobu 5, 10 a 15 minut.

Do dalších dvou jamek z každé série (fibrin(ogen)ová vrstva, fibrinová síť) bylo pipetováno 300  $\mu$ l roztoku PPACK (10  $\mu$ mol/l) s hirudinem (6 U/ml) na dobu 5 a 15 minut.

Po stanovené době působení roztoku PPACK a roztoku PPACK s hirudinem byly jamky 5krát propláchnuty Tris pufrém a následně do nich bylo pipetováno 300  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu (0,1 mmol/l). Roztok chromogenního substrátu byl ve všech jamkách po dobu 90 minut. Po této době byla reakce zastavena přidáním 100  $\mu$ l 30% kyseliny octové. Byla změřena absorpance výsledných roztoků při 405 nm.

### 3.2.7 SPR - měření

Jako SPR čipy byly použity mikroskopická sklíčka se zlatou vrstvou (50 nm) napařenou přes tenkou adhezivní vrstvu titanu (2 nm). Čipy byly nejprve několikrát opláchnuty etanolem a Q-vodou a poté usušeny proudem dusíku. Následně byly 30 min ozařovány UV, opět opláchnuty etanolem a Q-vodou a znovu usušeny proudem dusíku. Čip byl skleněnou stranou přitlačen k BK7 skleněnému hranolu a na jeho zlatý povrch byla připevněna čtyřkanálová průtoková cela. Konstantní průtok udržovala peristaltická pumpa. Roztoky byly měněny zastavením pumpy, přemístěním vstupu hadičky do příslušného roztoku a opětovného spuštění pumpy. Použité roztoky byly před samotným měřením odvzdušněny.

Měření byla prováděna *in situ* současně ve čtyřech kanálech SPR přístrojem založeným na Kretchmanově geometrii a hledání rezonanční vlnové délky, který byl zkonstruován v Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR. Skokové posuny rezonanční vlnové délky plasmonu odpovídají změně indexu lomu příslušných roztoků. Změny v množství fibrinogenu imobilizovaného u povrchu zlaté vrstvy jsou úměrné posunu rezonanční vlnové délky v nm. Rychlost průtoku roztoků v detekčních kanálech byla ve většině měření 25  $\mu$ l/min. Měření probíhalo vždy při teplotě 25°C, kterou udržoval termostat.

### **3.2.8 Detekce fibrinogenu v depositu plasmy a séra**

Na povrch zlatého čipu bylo nejprve působeno neředěnou lidskou plasmou a sérem po dobu 30 minut. Po 30 minutách byl k čipu přiváděn Tris pufr a poté roztok trombinu (2,5 U/ml) po dobu 15 minut. Následně byl k povrchu přiveden Tris pufr a roztok fibrinogenu (200  $\mu$ g/ml) obohacený o antitrombin III (0,5U/ml) a heparin (60 $\mu$ g/ml). Množství fibrinogenu přítomného na povrchu zlatého čipu bylo následně porovnáváno pomocí polyklonální protilátky proti fibrinogenu (0,1%).

K povrchu čipu byly roztoky přiváděny v uvedeném pořadí, po uvedené době:

1. Plasma/ sérum – 30 min
2. Tris pufr
3. Trombin (2,5 U/ml) – 15 min
4. Tris pufr
5. Roztok heparinu (60  $\mu$ g/ml), antitrombinu III (0,5 U/ml ) a fibrinogenu (200  $\mu$ g/ml ) – 45 min
6. Tris pufr
7. Protilátka proti fibrinogenu (aFbg) (0,1 %) – 45 min

### **3.2.9 Interakce depositu plasmy s trombinem a fibrinogenem**

Na povrch zlatého čipu bylo nejprve působeno neředěnou lidskou plasmou po dobu 30 minut. Následně byl k povrchu přiveden tris pufr. Do jednoho kanálu byl přiveden roztok trombinu (2,5U/ml) na 15 minut. Pak byl povrch opláchnut tris pufr a přiveden k povrchu roztok fibrinogenu (200  $\mu$ g/ml ) obohacený o antitrombin III (0,5U/ml) a heparin (60 $\mu$ g/ml). Množství fibrinogenu přítomného na povrchu zlatého čipu bylo následně porovnáváno

pomocí polyklonální protilátky proti fibrinogenu (0,1%).

K povrchu čipu byly roztoky přiváděny v uvedeném pořadí, po uvedené době:

Plasma 1

1. Plasma – 30 min

2. Tris pufr

3. Roztok trombinu (2,5 U/ml) – 15 min

4. Tris pufr

5. Roztok Fbg (200 µg/ml), ATIII (0,5 U/ml) – 60 min

6. Tris pufr

7. aFbg (0,1 %) – 45 min

Plasma 2

1. Plasma – 30 min

2. Tris pufr

3. Roztok Fbg (200 µg/ml), ATIII (0,5 U/ml), heparin (60 µg/ml) – 45 min

4. Tris pufr

5. aFbg (0,1 %) 45 min

### **3.2.10 Vliv heparinu na růst fibrinové sítě z depositu plasmy**

Na povrch zlatého čipu bylo nejprve působeno neředěnou lidskou plasmou po dobu 30 minut. Následně byl k povrchu přiveden Tris pufr a roztok trombinu (2,5U/ml) na 15 minut. Pak byl povrch opláchnut Tris pufr a přiveden k povrchu roztok fibrinogenu (200 µg/ml) obohacený o antitrombin III (0,5U/ml) v jednom kanálu a ve druhém o antitrombin III (0,5U/ml) a heparin (60µg/ml). Množství fibrinogenu přítomného na povrchu zlatého čipu bylo následně porovnáváno pomocí polyklonální protilátky proti fibrinogenu (0,1%).

Roztoky byly k povrchu čipu přiváděny v uvedeném pořadí, po stanovenou dobu.

1. Plasma – 30 min

2. Tris pufr

3. Roztok trombinu (2,5 U/ml) – 15 min

4. Tris pufr

5. Roztok Fbg (200 µg/ml), ATIII (0,5 U/ml) – 60 min

6. Tris pufr

7. aFbg (0,5 %) – 60 min

1. Plasma – 30 min

2. Tris pufr

3. Roztok trombinu (2,5 U/ml) – min

4. Tris pufr

5. Roztok Fbg (200 µg/ml), ATIII (0,5 U/ml), heparin (60 µg/ml) – 45 min

6. Tris pufr

7. aFbg (0,1 %) – 45 min

### **3.2.11 Kinetika interakce Fbg s fibrinovou sítí**

Tenká povrchová fibrinová síť byla připravena na povrchu zlatého čipu dle postupu uvedeného v kap. 2.3.2. Ve druhém kroku byl roztok fibrinogenu obohacen antitrombinem III (0,5U/ml) a heparinem (60µg/ml). Čip byl vložen do přístroje SPR, kde se k povrchu nechal na 15 minut přivést opět roztok trombinu (2,5U/ml), jehož úlohou bylo povrch sítě aktivovat odštěpením fibrinopeptidů ze sítě tam, kde nebyly odštěpeny při tvorbě sítě. Trombin, který se při tomto procesu navázal na síť, byl inaktivován působením roztoku PPACK (10 µmol/l). K povrchu čipu byl poté přiváděn roztok fibrinogenu o různých koncentracích (2 – 200µg/ml). V posledním kroku se k povrchu čipu přiváděl všemi hadičkami Tris pufr.



## 4 Výsledky a diskuze

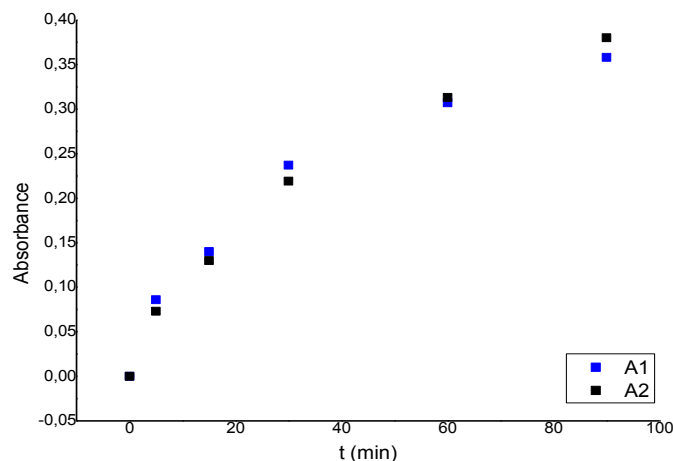
### 4.1 Měření aktivity povrchově vázaného trombinu

#### 4.1.1 Množství navázaného trombinu na fibrin(ogen)ové vrstvě s časem

Jak bylo zmíněno v úvodu práce, trombin se může vázat na fibrinogen prostřednictvím řetězce  $\gamma'$  a takto navázaný trombin zůstává nadále aktivní [9]. K určení aktivity povrchově vázaného trombinu je možné použít chromogenní substrát, což je bezbarvá látka, která je substrátem pro trombin. Po proteasovém působení trombinu na chromogenní substrát vzniká barevný produkt (např. p-nitroanilin). V této práci byl použit chromogenní substrát S-2238 (angl. H-D-Phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride). Nárůst absorbance výsledného roztoku při 405 nm je pak úměrný enzymatické aktivitě trombinu navázaného na povrchu. Jak je možné vidět na obr. 5 a v tabulce 1, aktivita trombinu, který se váže na fibrin(ogen)ovou (Fbg/Fb) vrstvu roste se vzrůstající dobou působení roztoku trombinu na Fbg/Fb vrstvu. Ze získaných dat je patrné, že v počáteční fázi dochází k velmi rychlé interakci trombinu s povrchem. Po 60 minutách působení roztoku Thr se nárůst aktivity začíná pomalu ustalovat. Přibližně po 90 minutách působení trombinu na Fbg/Fb vrstvu se hodnota aktivity blíží maximu, to znamená, že po určité době dochází k vysycení vazebních míst pro trombin na povrchu Fbg/Fb vrstvy a s delší dobou působení roztoku trombinu na Fbg/Fb povrch již nedochází k navázání dalšího trombinu.

**Tab. 1: Závislost aktivity povrchově vázaného trombinu na čase.** Měření bylo provedeno pro dva stejným způsobem provedené pokusy, kdy se trombin vázal na Fbg/Fb monovrstvu z roztoku o koncentraci 2,5 U/ml. A1 a A2 jsou absorbance pro obě sady měření, přičemž absorbance je úměrná aktivitě navázaného množství trombinu. Absorbance byla měřena při vlnové délce 405 nm.

t/ min	0	5	15	30	60	90
A1	0	0,086	0,140	0,237	0,307	0,358
A2	0	0,073	0,130	0,219	0,313	0,380



**Obr 5: Závislost aktivity trombinu, povrchově vázaného na Fbg/Fb vrstvu, na čase.** Trombin se vázal na Fbg/Fb monovrstvu z roztoku o koncentraci 2,5 U/ml. Fibrin(ogen)ové vrstvy byly navázané na povrch polystyrenových jamek titrační deštičky z roztoku fibrinogenu o koncentraci 5 µg/ml. Měřeno s použitím chromogenního substrátu jako absorbance při 405 nm.

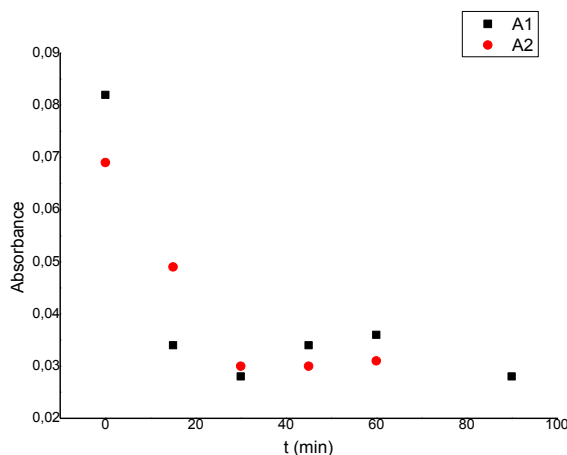
#### 4.1.2 Měření uvolňování trombinu z Fbg/Fb vrstvy

Z minulého experimentu jsme zjistili, že se trombin váže na fibrin(ogen)ovou monovrstvu. Následně jsme chtěli zjistit, jak je tato vazba stabilní a jestli se může navázaný trombin opět uvolnit do roztoku. Opět měřeno spektrofotometricky s použitím chromogenního substrátu S-2238.

Z grafu závislosti absorbance na čase působení Tris pufru na fibrin(ogen)ovou vrstvu s navázaným trombinem (Obr. 6) je viditelný pokles množství trombinu, které bylo původně navázano na fibrin(ogen)ovou vrstvu. Původnímu množství navázaného trombinu odpovídá první hodnota absorbance v čase 0 minut. Pokles množství trombinu značí, že část původně navázaného trombinu se uvolňovala z povrchu fibrin(ogen)ové vrstvy do přítomného Tris pufru. Trombin se z fibrin(ogen)ové vrstvy nejdříve uvolňoval rychle, pak se tento pokles už přibližně po 15 minutách působení Tris pufru ustálil - po 15 minutách se již trombin do roztoku neuvolňoval. Tento trombin byl tedy zřejmě pevně navázan na fibrin(ogen)ovou monovrstvu. Z literatury je známo, že fibrinogen má na svém povrchu více vazebných míst s různou afinitou k trombinu, tzv. vysokoafinitní místa a nízkoafinitní místa [9]. Lze tedy předpokládat, že množství trombinu, které již nebylo možné odmyt Tris puforem je navázano do některého z vysokoafinitních míst na fibrinogenu, patrně na  $\gamma'$  řetězci.

**Tab. 2: Aktivita povrchově vázaného trombinu v závislosti na čase.** Trombin byl po stanovenou dobu uvolňován z povrchu fibrin(ogen)ové vrstvy do Tris pufru. A1 a A2 jsou absorbance pro dvě sady měření. Absorbance je úměrná aktivitě trombinu, byla měřena při vlnové délce 405 nm.

t/ min	0	15	30	45	60	90
A1	0,082	0,034	0,028	0,034	0,036	0,028
A1	0,069	0,049	0,030	0,030	0,031	0,030



**Obr. 6: Uvolňování trombinu vázaného na fibrin(ogen)ovou vrstvu do prostředí Tris pufru.** Trombin byl původně vázán z roztoku o koncentraci 2,5 U/ml na povrch fibrin(ogen)ové vrstvy, navázaný na povrch polystyrenových jamek titrační desičky z roztoku fibrinogenu o koncentraci 5 µg/ml. Měřeno s použitím chromogenního substrátu jako absorbance při 405 nm.

#### 4.1.3 Měření uvolňování trombinu z Fbg/Fb vrstvy vlivem roztoku fibrinogenu

V předchozích experimentech jsme zjistili, že trombin se může vázat na fibrin(ogen)ovou monovrstvu a že takto navázaný trombin zůstává i nadále katalyticky aktivní. Jeho aktivitu jsme prokázali pomocí chromogenního substrátu. Nespecificky navázaný trombin se postupně uvolňoval do roztoku Tris pufru a absorbance v roztoku po 90 minutách dosahovala hodnot kolem 0,03.

Z dřívějších experimentů je známo, že působením povrchově vázaného trombinu na roztok fibrinogenu dochází k tvorbě fibrinové sítě od povrchu. Je-li navíc použit inhibitor antitrombin III, dochází ke vzniku tenké fibrinové sítě v řádu desítek až stovek nanometrů, při čemž po nějaké době dochází k zastavení růstu fibrinové sítě [38]. V této části jsme se snažili zjistit, zda k zastavení růstu dochází v důsledku postupného přerůstání navázaného trombinu

fibrinovou sítí až do okamžiku, kdy zůstává nepřístupný pro další molekuly fibrinogenu, ale přitom povrchově stále aktivní. Nebo zda je v důsledku svého působení postupně inhibován antitrombinem III.

Porovnávali jsme tedy pokles aktivity povrchově vázaného trombinu působením tris pufru (odmývání) s působením roztoku fibrinogenu s ATIII a heparinem. Z hodnot absorbance v závislosti na čase v obou měření (Tabulky 3 a 4) je možné vidět množství aktivního trombinu, který se uvolňoval do Tris pufru, nebo pokles aktivity v přítomnosti roztoku Fbg, ATIII s heparinem.

Rozdíl mezi měřeními 1 a 2 je v přidavku roztoku heparinu, antitrombinu III a fibrinogenu po navázání trombinu na fibrinogenovou monovrstvu na povrchu čipu v měření 2. Přidáním tohoto roztoku je fibrinogen z roztoku štěpený trombinem, který byl původně navázán na fibrinogenovou monovrstvu a tímto způsobem se vytvoří na dně jamek tenká vrstva fibrinové sítě.

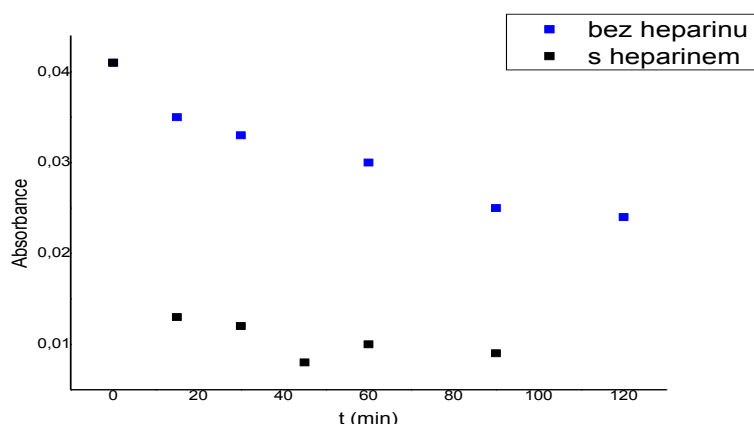
Z pozorování výsledků měření 1 a 2 (Tabulka 3 a 4, Obr. 7) je patrné, že v prvním měření, kde se nevytvářela fibrinová síť v přítomnosti antitrombinu III a heparinu, se hodnoty absorbance ustálily kolem 0,025 a.u., což je v dobré shodě s předchozím pokusem, kdy se hodnota absorbance ustálila na hodnotě 0,03 a.u. Množství přítomného aktivního trombinu v přítomnosti roztoku Fbg, ATIII s heparinem klesalo výrazně rychleji a po 90 minutách se hodnota absorbance ustálila na 0,009 a.u. Z naměřených dat se dá předpokládat, že trombin působením roztoku fibrinogenu a ATIII s heparinem byl postupně inhibován, ale ani po 90 minutách nedošlo k úplné inhibici povrchově vázaného trombinu.

**Tab. 3: Uvolňování trombinu z fibrin(ogen)ové vrstvy do Tris pufru.** Trombin byl na fibrin(ogen)ovou vrstvu navázán z roztoku o koncentraci 2,5 U/ml, do Tris pufru byl uvolňován po stanovenou dobu. Absorbance roztoku (A), úměrná aktivitě trombinu, byla určena spektroskopicky při 405 nm.

t/ min	0	15	30	60	90	120
A	0,041	0,035	0,033	0,030	0,025	0,024

**Tab. 4: Aktivita povrchově vázaného trombinu v přítomnosti roztoku Fbg, ATIII s heparinem.** Absorbance (A) roztoku, úměrná aktivitě trombinu, byla měřena spektrofotometricky při 405 nm.

t/ min	0	15	30	45	60	90
A	0,041	0,013	0,012	0,008	0,010	0,009



**Obr. 7: Porovnání aktivity povrchově vázaného trombinu v prostředí Tris pufru a roztoku Fbg, ATIII s heparinem.** Trombin byl původně navázán na fibrinogennou vrstvu z koncentrace 2,5 U/ml.

#### 4.1 Inhibice povrchově vázaného trombinu pomocí PPACK a hirudinu

Použitím přímých inhibitorů trombinů nezávislých na antitrombinu III jsme si chtěli ověřit možnost inhibice povrchově vázaného trombinu [39]. Sledovali jsme jak inhibici trombinu navázaného na fibrin(ogen)ovou vrstvu, tak také na fibrinovou síť. Jako inhibitory byl použit PPACK a PPACK v přítomnosti hirudinu.

Body v čase 0 min, v tabulce 6 a také na obr.12, představují aktivitu navázaného trombinu na fibrin(ogen)ovou vrstvu a na fibrinovou síť (v nepřítomnosti inhibitorů). Je patrný rozdíl v aktivitě, a tedy v množství aktivního trombinu, který se navázal na fibrin(ogen)ovou vrstvu v porovnání s jeho množstvím navázaným na fibrinové síti. Důvodem je větší kapacita pro navázání trombinu na povrchu sítě oproti povrchu fibrin(ogen)ové monovrstvy.

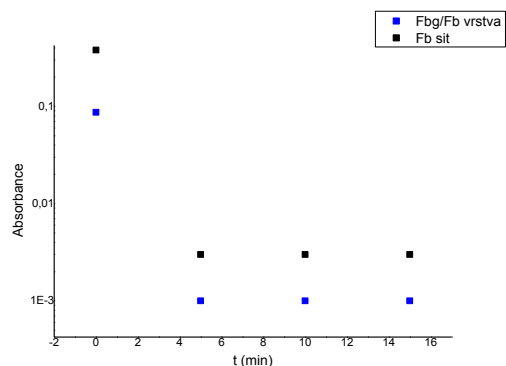
Již po 5 minutách působení roztoku PPACK, a také roztoku PPACK s hirudinem, pak klesla aktivita trombinu (původně) navázaného jak na fibrin(ogen)ovou vrstvu, tak na fibrinovou síť, téměř na nulovou hodnotu, což značí velkou inhibiční schopnost přítomného PPACK, případně PPACK v přítomnosti hirudinu. Porovnáním aktivity trombinu

po působení roztoku PPACK a roztoku PPACK s hirudinem je zřejmé, že samotný PPACK má téměř stejný inhibiční účinek jako kombinace PPACK s hirudinem, i když malý rozdíl v účinku je pozorovatelný, v prospěch přítomnosti obou inhibitorů. Ze získaných výsledků lze potvrdit, že povrchově vázaný trombin je možné inhibovat inhibitory nezávislými na antitrombinu III jako jsou například PPACK a hirudin.

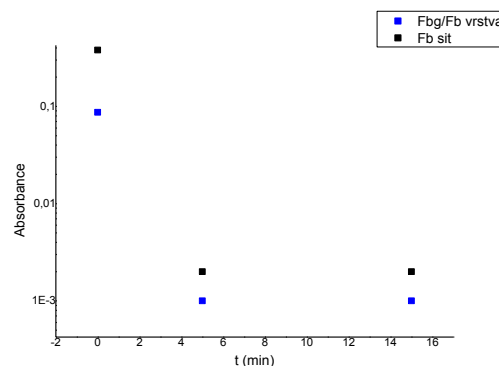
**Tabulka 6: Závislost aktivity trombinu na délce působení roztoku PPACK, a roztoku PPACK s hirudinem.** Trombin se původně navázal na Fbg vrstvu nebo na Fb síť.  $A_{Fbg}$  a  $A_{Fb\text{ síť}}$  jsou absorbance pro dvě sady měření v závislosti na povrchu, na který byl trombin vázán. Absorbance je úměrná aktivitě trombinu, byla měřena při vlnové délce 405 nm.

	Bez inhibitoru	PPACK			PPACK + hirudin	
t/min	0	5	10	15	5	15
$A_{Fbg}$	0,087	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
$A_{Fb\text{ síť}}$	0,380	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002

a)



b)



**Obr. 12: Inhibice povrchově vázaného trombinu účinkem PPACK a PPACK s hirudinem.** Spektrofotometrické stanovení aktivity trombinu, který se navázal na vrstvu fibrinogenu nebo na připravenou fibrinovou síť a byl následně inhibován a) působením roztoku PPACK po dobu 5, 10 a 15 minut, nebo b) působením roztoku PPACK s hirudinem po dobu 5 a 15 minut.. Graf vytvořen s použitím logaritmického měřítka pro hodnoty absorbance.

## 4.2 Vliv antitrombinu III na růst povrchové fibrinové sítě

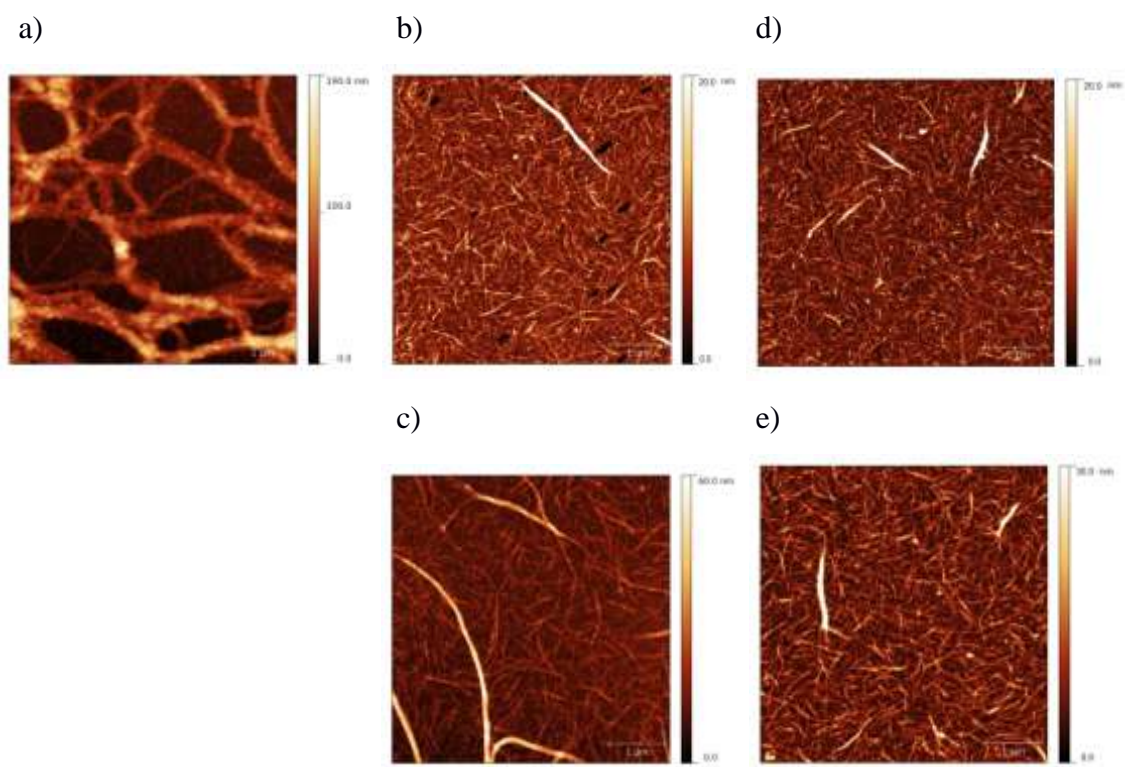
Antitrombin III je přirozeným fyziologickým inhibítohem trombinu, který se významnou mírou účastní tvorby fibrinové sítě v procesu srážení krve. Pro porovnání vlivu koncentrace antitrombinu III na tvorbu sítě byly podle postupu 2.3.2 vytvořeny na mikroskopických sklíčkách fibrinové sítě s použitím různých koncentrací antitrombinu III. Tyto sítě byly na povrchu sklíček usušeny lyofilizací a následně byly zobrazeny mikroskopem atomárních sil (Obr. 8).

Roztok fibrinogenu a antitrombinu III (0,1; 0,25; 0,5 a 0,75 U/ml) ve druhém kroku se nechal působit po dobu 15 a 60 minut. Fibrinová síť se tvořila v roztoku fibrinogenu u povrchu katalytickým působením molekul trombinu navázaných na adsorbovanou monovrstvu fibrin(ogen)u a molekul trombinu, které se postupně uvolňovaly z povrchu do roztoku.

Na obr. 8 jsou porovnány připravené sítě také v závislosti na době působení roztoků (ATIII + Fbg). Jak je možné vidět z obrázku 8 v obou případech použití vyšších koncentrací antitrombinu III a působení po dobu 15 minut jsou vytvořené sítě poměrně malé a rozdíl mezi těmito sítěmi není velmi výrazný. Trochu větší oproti sítím na obr. 8b) a 8d) je pak síť 8e), která byla připravena s použitím koncentrace antitrombinu III 0,75 U/ml a doba působení roztoku Fbg, ATIII byla 60 minut. Koncentrace antitrombinu III byla větší než v případě přípravy sítě na obr. 8b), ovšem 15 minut působení roztoku Fbg s ATIII (0,5 U/ml) nebylo postačující pro vznik dostatečně velké sítě, v tomto případě byla tedy významnější doba, po kterou síť vznikala, než koncentrace inhibitoru. Výrazně větší síť vznikla působením roztoku Fbg s antitrombinem III o koncentraci 0,5 U/ml po dobu 60 minut (Obr. 8c). Zde jsou patrná delší rozvětvené vlákna na povrchu a celkově výraznější vlákna sítě oproti výše zmíněným sítím.

Největší síť pak viditelně vznikla v případě nejnižší koncentrace antitrombinu III (0,25 U/ml), zde jsou viditelná velká sesít'ovaná vlákna. Tato síť je výrazně větší i oproti síti 8c). Zde se víc projevil vliv koncentrace antitrombinu III než doba vzniku sítě.

Síť, která byla připravena s použitím roztoku fibrinogenu (200 µg/ml) s antitrombinem III (0,25 U/ml) a jeho působení po dobu 60 minut a také obě sítě připraveny s použitím roztoku fibrinogenu (200 µg/ml) s antitrombinem III (0,1 U/ml) po dobu 15 a 60 minut nebylo možné zobrazit použitím mikroskopu atomárních sil, jelikož rozměry těchto sítí přesahovaly zobrazovací kapacitu mikroskopu.



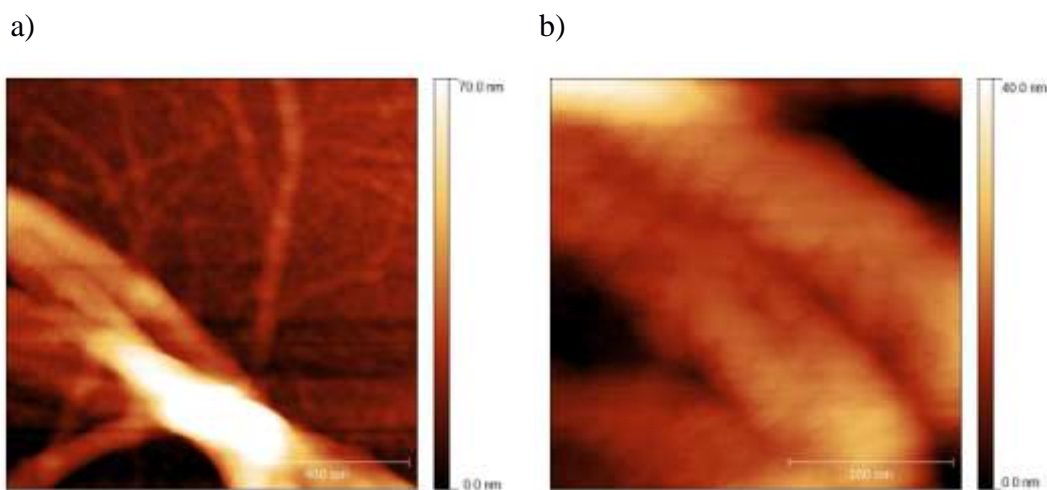
**Obr. 8: Vliv koncentrace ATIII a doby působení roztoku Fbg, ATIII na vzhled a velikost fibrinové sítě.**

Síť byla připravena adsorpcí fibrinogenu z roztoku o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 90 minut, následně navázáním trombinu z roztoku 2,5 U/ml po dobu 15 minut na takto vzniklou Fbg/Fb vrstvu a nakonec působením roztoku Fibrinogenu (200  $\mu\text{g/ml}$ ) a ATIII v koncentracích 0,5 U/ml nebo 0,75 U/ml po dobu 15 nebo 60 minut. Fibrinogen z roztoku byl aktivován navázaným trombinem na fibrin za vzniku fibrinové sítě, přičemž trombin, který byl uvolněn z povrchu Fbg/Fb vrstvu do roztoku, byl inhibován přítomným ATIII.

a) ATIII 0,25 U/ml, 15 minut; b) ATIII 0,5 U/ml, 15 minut; c); ATIII 0,5 U/ml, 60 minut d) ATIII 0,75 U/ml, 15 minut; e) ATIII 0,75 U/ml 60 minut;

Na obrázku 9 jsou fibrinová vlákna, která byla zobrazena mikroskopem atomárních sil. Síť, jejíž vlákna jsou na tomto obrázku zobrazena, byla připravena působením roztoku Fbg (200  $\mu\text{g/ml}$ ) s antitrombinem III (0,5 U/ml) na fibrin(ogen)ovou monovrstvu s navázaným trombinem. Na vlákně je pozorovatelné střídání pruhů, které odpovídají popsanému vzoru a vzdáleností 22,5 nm mezi jednotlivými pruhy. Jejich vzdálenost tedy odpovídá polovině délky molekuly fibrinogenu, jak bylo popsáno v úvodu. [29] Doposud pouze jedna skupina na světě byla schopna pořídit snímky z AFM, které by zobrazovaly žebrování fibrinové sítě [40].





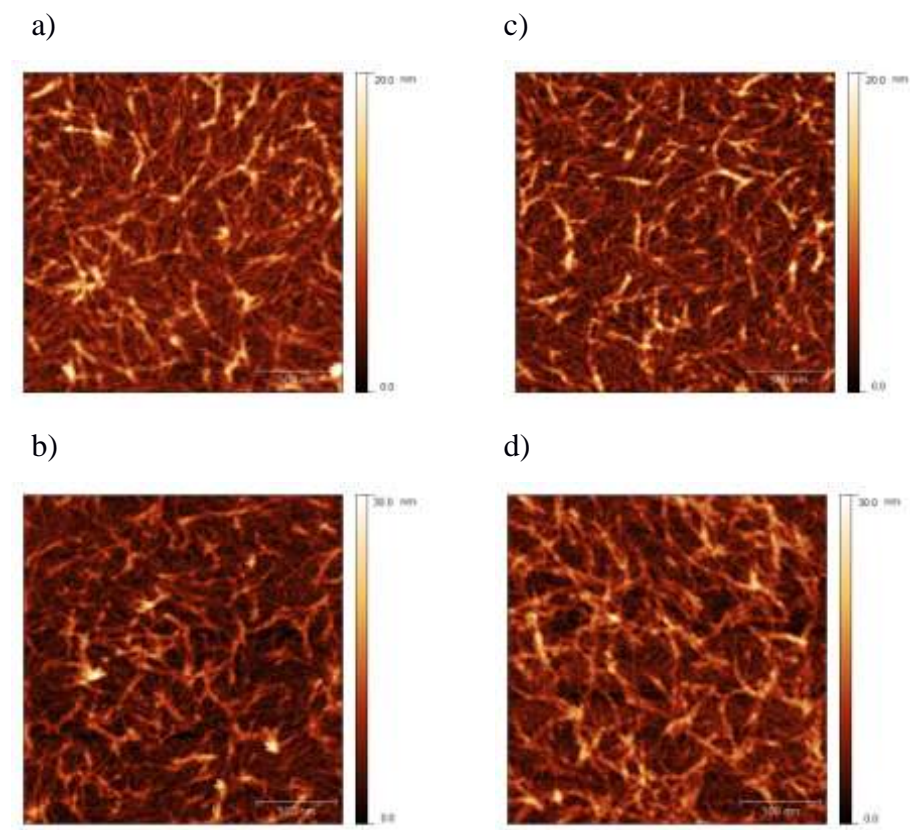
**Obr 9: Vzor pravidelně se opakujících pruhů fibrinového vlákna.** Vzdálenost těchto pruhů odpovídá polovině délky molekuly fibrinogenu. Zobrazeno mikroskopem atomárních sil. Obrázek a) je 1x1 nm, b) představuje výsek z a) o velikosti 0,25x0,25 nm

### 4.3 Vliv antitrombinu III s heparinem na růst povrchové fibrinové sítě

V tomto případě byla mikroskopem atomárních sil pozorována fibrinová síť v závislosti na působení roztoků Fbg (200  $\mu\text{g/ml}$ ) s antitrombinem III o různých koncentracích (0,1 U/ml; 0,25 U/ml; 0,5 U/ml a 0,75 U/ml), tentokrát v přítomnosti heparinu (60  $\mu\text{g/ml}$ ), viditelné na obr 10. Naproti tomu, že síť vytvořené s použitím roztoků Fbg (200  $\mu\text{g/ml}$ ) jen s ATIII o různých koncentracích byly jednoznačně rozdílné v závislosti na koncentraci ATIII, síť, kde byl v roztoku přítomen také heparin (60  $\mu\text{g/ml}$ ) jsou přibližně stejné a podstatně menší (než v případě, kde nebyl heparin použit). To, že mezi sítěmi vytvořenými s použitím roztoku Fbg (200  $\mu\text{g/ml}$ ), Hep (60  $\mu\text{g/ml}$ ) a ATIII (různé koncentrace)) není veliký rozdíl, ukazuje i tabulka 5 kde jsou určeny výšky vytvořené fibrinové sítě v závislosti na koncentraci ATIII v roztoku.

Mikroskopem atomárních sil pořízené obrázky připravených fibrinových sítí byly použity pro zjištění přibližné výšky těchto sítí. V programu Gwyddion (pro úpravu obrázků z AFM) byl zobrazen reliéf povrchu sklíčka (spodní křivka grafu č.1) a síť, která byla na povrchu tohoto sklíčka připravena (vrchní křivka grafu č.1). Vzorek s fibrinovou sítí byl proškrábnut ostrým hrotem, tak aby nedošlo k poškození sklíčka. Výsledný obrázek byl nasnímán na rozhraní sklo-fibrinová síť. Z rozdílu z-osy se pak stanovila průměrná tloušťka fibrinové sítě. Na křivkách jsou patrné nerovnosti povrchu jak sklíčka, tak i povrchu sítě. Nerovnosti na povrchu sítě představují jednotlivá vlákna této sítě. Obě křivky byly

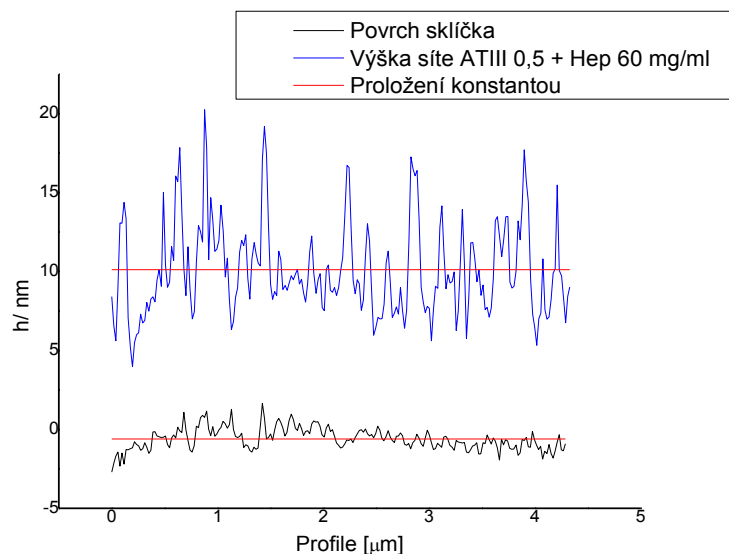
v programu Origin proloženy přímkami, jejichž výšky odpovídají průměrným hodnotám výšek povrchu sklíčka (odpovídá nulové hodnotě) a povrchu sítě. Z rozdílu těchto přímek byla určena přibližná hodnota výšky připravené fibrinové sítě (tabulka 5).



**Obr. 10:** Vliv přítomnosti heparinu na vzhled a velikost fibrinové sítě při použití různých koncentrací ATIII v roztoku s Fbg. Sít' byla připravena adsorpcí fibrinogenu z roztoku o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 90 minut, následně navázáním trombinu z roztoku 2,5 U/ml po dobu 15 minut na takto vzniklou Fbg/Fb vrstvu a nakonec působením roztoku Fibrinogenu (200  $\mu\text{g/ml}$ ) a ATIII o koncentracích a) 0,1 U/ml; b) 0,5 U/ml; c) 0,25 U/ml a d) 0,75 U/ml, všechny v přítomnosti heparinu (60  $\mu\text{g/ml}$ ) po dobu 60 min.

**Tabulka 5:** výška připravené fibrinové sítě v závislosti na koncentraci použitého ATIII v přítomnosti heparinu (60  $\mu\text{g/ml}$ ).

$c_{\text{ATIII}}/ \text{U/ml}$	0,1	0,25	0,5	0,75
$h/ \text{nm}$	18,6	11,7	10,7	9,33



**Obr. 11:** Zobrazení určení výšky fibrinové sítě z rozdílu průměrné výšky sítě oproti průměrné výšce mikroskopického sklíčka. Linie zobrazují průřez povrchem mikroskopického sklíčka (černá), průřez povrchem fibrinové sítě (modrá) a průměrnou hodnotu obou linií (červená).

## 4.4 SPR měření

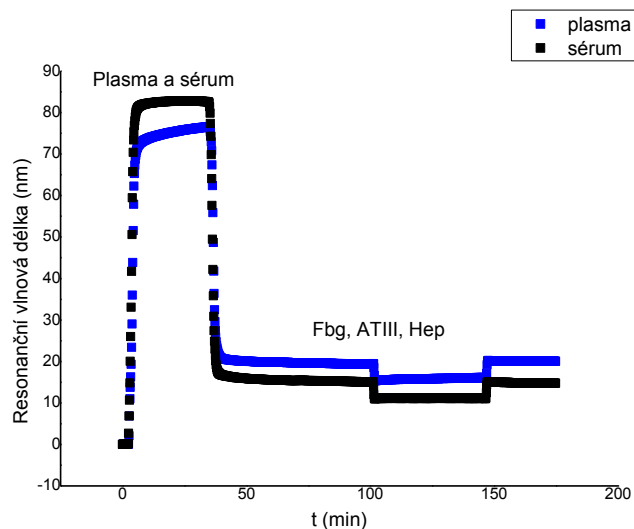
### 4.4.1 Detekce fibrinogenu v depositu plasmy a séra

Okamžitě po kontaktu krve s umělým materiálem dochází k adsorpci proteinů krevní plasmy na povrch materiálu. Jedním z nejzastoupenějších proteinů krevní plasmy je fibrinogen, který se velkou mírou podílí na následných reakcích organismu vůči umělému materiálu [41]. Přítomnost fibrinogenu v depositu plasmy jsme se snažili dokázat pomocí SPR, porovnáním depositu krevní plasmy a séra (sérum je složením identické s krevní plasmou, jen neobsahuje fibrinogen, neboť u něj dochází ke koagulaci a následnému vymíchání fibrinové sítě).

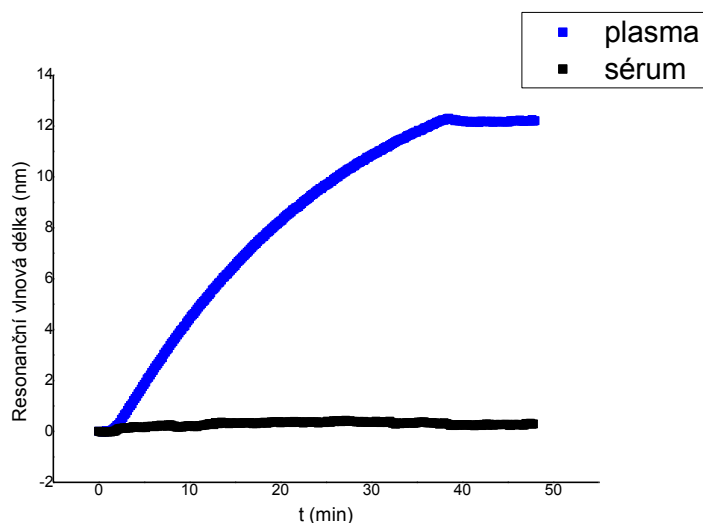
Pro porovnání byly zvoleny dva grafy. Jedním ze 4 kanálů přístroje SPR byl přiváděn k čipu roztok séra a druhou roztok plasmy. V případě plasmy se na povrch čipu, kromě dalších proteinů, předpokládá navázání přítomného fibrinogenu, který by se v séru nacházet neměl.

Na obr. 13 jsou tedy dvě linie odpovídající dvěma kanálům přístroje SPR. Po přivedení plasmy (modrá) a séra (černá) je viditelný nárůst odezvy odpovídající změně optické hustoty prostředí v blízkosti zlatého povrchu čipu. Linie grafu stoupají do různé výše, což značí rozdílnou optickou hustotu plasmy a séra. Tento rozdíl je způsoben jejich rozdílným

složením. Na grafu odpovídající krevní plasmě také zřetelněji vidno úsek s postupným nárůstem, který značí postupné navázání proteinů obsažených v plasmě na povrch čipu. Graf výrazně klesá po výměně plasmy a séra za Tris pufr. Prudká změna na počátku a konci působení séra je dána rozdílným indexem lomu séra a plasmy v porovnání s tris pufrem. Linie ovšem neklesnou na původní hodnotu, to je důsledkem adsorpce proteinů na povrchu čipu. Rozdíl v SPR signálu původní hodnoty a hodnoty po působení plasmy odpovídá přibližně 20 nm. Pro sérum rozdíl těchto hodnot odpovídá přibližně 16 nm, což značí, že se z plasmy a ze séra na povrch čipu navázaly proteiny. Následně je na grafu viditelný náhlý pokles, který odpovídá působení roztoku heparinu, fibrinogenu a antitrombinu III, pokles je opět způsoben rozdílnou hodnotou indexu lomu roztoku fibrinogenu s ATIII a heparinu oproti tris pufru. Poté se linie grafu po výměně tohoto roztoku za Tris pufr dostávají opět na původní hodnotu, jakou měli před působením roztoku Fbg, ATIII s heparinem. Z tohoto důvodu se nedá soudit, že by se z roztoku Fbg, ATIII, Hep navázalo nějaké množství Fbg na původní navázanou vrstvu proteinů z plasmy, případně ze séra.



**Obr. 13:** první část grafu pro detekci fibrinogenu v depositu plasmy a séra. Změny v grafu odpovídají změnám indexu lomu použitých roztoků v blízkosti povrchu čipu přístroje využívajícího metodu resonance povrchových plasmonů.



**Obr. 14: Porovnání množství Fbg v depositu plasmy a séra.** Fibrinogen byl prokázán protilátkou proti fibrinogenu. Zobrazeno metodou resonance povrchových plasmonů

Obr. 14 představuje pokračování obr. 13 a zobrazuje porovnání množství přítomného Fbg na povrchu čipu po přidání protilátky proti Fbg. Křivka odpovídající monovrstvě z plasmy (modrá) postupně s časem roste, zatím co křivka odpovídající monovrstvě proteinů ze séra (černá) nejeví viditelný nárůst. Z porovnání těchto dvou grafů je patrné, že v případě plasmy bylo na konci přítomné určité množství fibrinogenu, které bylo prokázáno protilátkou. V případě séra, v kterém by se neměl nacházet Fbg, je graf po přidání protilátky téměř lineární a to i navzdory skutečnosti, že se na čip také nechal působit roztok, který Fbg obsahoval. Fbg přítomný v tomto roztoku se tedy na čip nenavázal.

#### 4.4.2 Interakce depositu plasmy s trombinem a fibrinogenem

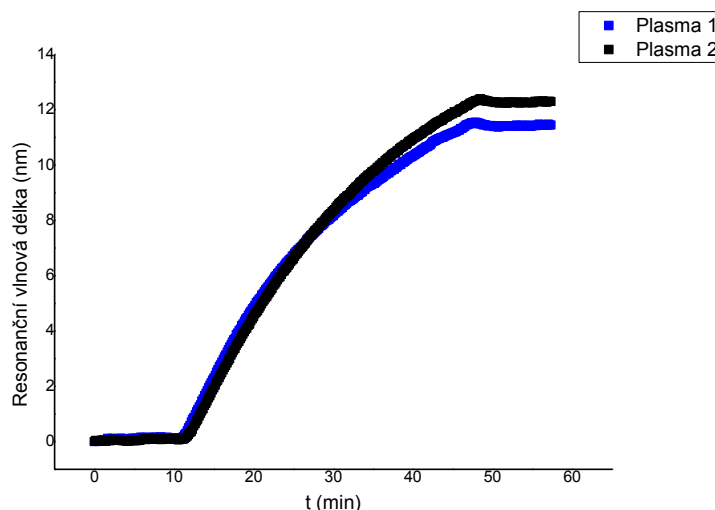
Dvěma hadičkami přístroje SPR se k povrchu čipu nejprve přiváděla plasma.

V případě plasmy se v jednom kanále (plasma 1) nechal k povrchu čipu přivádět roztok trombinu, a pak roztok heparinu, antitrombinu III a fibrinogenu. V druhém kanále s plasmou se po působení plasmy nechal působit jen roztok Fbg, ATIII s heparinem, bez předchozího působení roztoku Thr.

V plasmě je přítomen Fbg, který se váže na povrch čipu, jak jsme dokázali již v předchozím experimentu. Na tento navázaný Fbg by se v dalším kroku měl navázat Thr, což jsme dokázali v experimentech popsanych v kapitole 3.1. Po působení roztoku Fbg, ATIII a Hep se pak předpokládá vznik tenké fibrinové sítě působením trombinu, který se navázal

na Fbg (Fb), přičemž trombin, který se případně uvolní z Fbg/Fb je inhibován ATIII, v tomto případě v přítomnosti heparinu.

Po přidání protilátky proti Fbg je viditelný v obr. 15 malý rozdíl v průběhu nárůstu obou linií, přičemž linie, která odpovídá postupu bez působení Thr roste strměji a dosahuje za stejnou dobu působení protilátky vyšší hodnoty, než křivka, která odpovídá postupu s působením Thr.



**Obr. 15: Množství přítomného Fbg/Fb po interakci depositu plasmy s trombinem a fibrinogenem.** zobrazeno metodou resonance povrchových plasmonů s použitím protilátky proti Fbg. Křivka 1 (Plasma 1) odpovídá přítomnosti Fbg/Fb po interakci s trombinem, křivka 2 (Plasma 2) odpovídá množství Fbg/Fb po interakci plasmy s fibrinogenem v roztoku.

#### 4.4.3 Vliv heparinu na růst fibrinové sítě z depositu plasmy

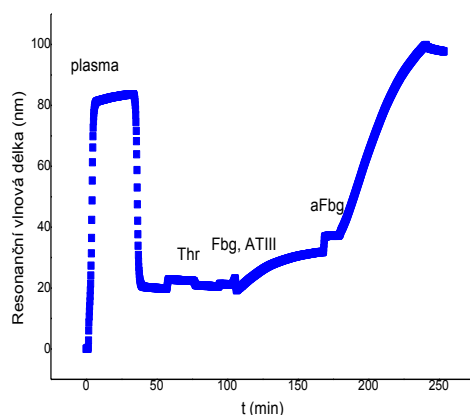
Metodou resonance povrchových plasmonů byl porovnán také účinek ATIII a ATIII v přítomnosti heparinu. Heparin zvyšuje rychlost inhibice ATIII asi 1000x [42].

K povrchu čipu byla dvěma kanály přivedena plasma, poté se nechal působit roztok trombinu. Jelikož by plasma měla obsahovat fibrinogen, trombin by se na něj měl navázat. Postup se v dalším kroku pro oba kanály lišil. V jednom kanále byl k čipu přiváděn roztok Fbg s ATIII a ve druhém roztok Fbg, ATIII v přítomnosti heparinu. V posledním kroku bylo dokazováno množství přítomného Fbg, ve vrstvě, která se navázala na povrch čipu, protilátkou proti Fbg.

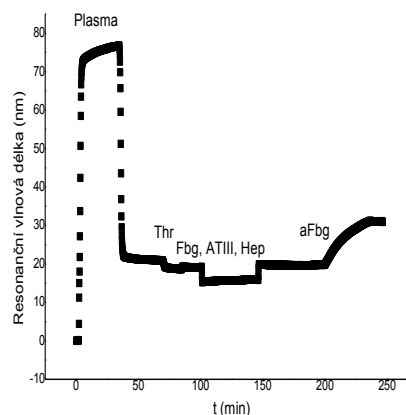
Obr. 16a) představuje průběh postupu, kde byl použit roztok jenom Fbg s ATIII, bez přítomnosti heparinu. Po přidání tohoto roztoku křivka grafu začíná viditelně růst,

což znamená, že se na povrchu čipu tvoří fibrinová síť. Růst křivky se ustaluje přibližně po 60 minutách působení roztoku Fbg, ATIII. Značný je také růst grafu po přidání protilátky proti fibrinogenu.

a)



b)

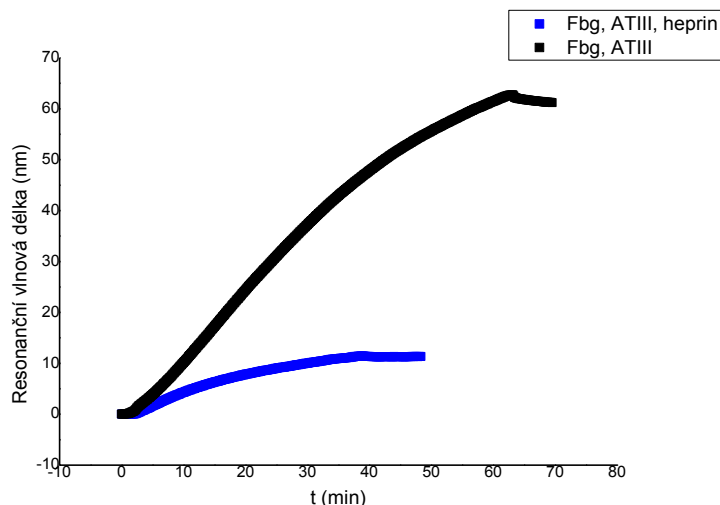


**Obr 16: Porovnání vlivu heparinu na vznik fibrinové sítě z depositu plasmy.** Zkratky v grafu označují místo přidání plasmy, Thr – trombinu, a) Fbg, ATIII – roztoku fibrinogenu s antitrombinem III, případně b) Fbg, ATIII, Hep – přidavek roztoku fibrinogenu s antitrombinem III v přítomnosti heparinu. Výsledné množství Fbg a Fb na povrchu čipů bylo prokázáno protilátkou proti Fbg (aFbg). Nárůst grafu a) po přidání roztoku Fbg s ATIII značí vznik fibrinové sítě, v přítomnosti protilátky proti Fbg pak značí velké množství fibrinu po vzniku fibrinové sítě. Zobrazeno metodou resonance povrchových plasmonů.

Křivka obr. 16b) znázorňuje průběh postupu za použití ATIII v přítomnosti heparinu, který několikanásobně zvyšuje rychlost inhibice trombinu prostřednictvím ATIII. Při působení roztoku Fbg, ATIII, Hep na Fbg/Fb vrstvu s navázaným trombinem, není viditelné téměř žádné stoupání grafu a po přidání protilátky proti Fbg/Fb je sice pozorovatelný nárůst křivky grafu, který ale není oproti grafu 16a) velmi význačný. Je možné, že společné působení ATIII a heparinu bylo schopné, v dynamických podmínkách SPR přístroje, efektivně inhibovat trombin, který se postupně uvolňoval z povrchu, při interakci s fibrinogenem. Stejným mechanismem je pravděpodobně inhibován trombin uvolněný z místa poranění do krevního řečiště, aby nedošlo k ucpání cévního systému.

Obr. 17 znázorňuje detailněji poslední krok postupu a porovnání částí křivek obr. 16 po přidání protilátky proti Fbg. V nepřítomnosti heparinu v roztoku s Fbg a ATIII (černá křivka) se na povrchu čipu vytvořila Fb síť, a tedy je v tomto případě přítomné větší množství

Fb a nárůst grafu po přidání protilátky proti Fbg je výrazný a po 60 minutách působení této protilátky dosahuje výšku přes 60 nm, přičemž ještě nedosáhl maxima. Naproti tomu graf, který odpovídá postupu s použitím heparinu (modrá křivka) roste mírně, dosahuje maxima již přibližně po 40 minutách, kdy dosahuje asi šestinu výšky křivky 1.

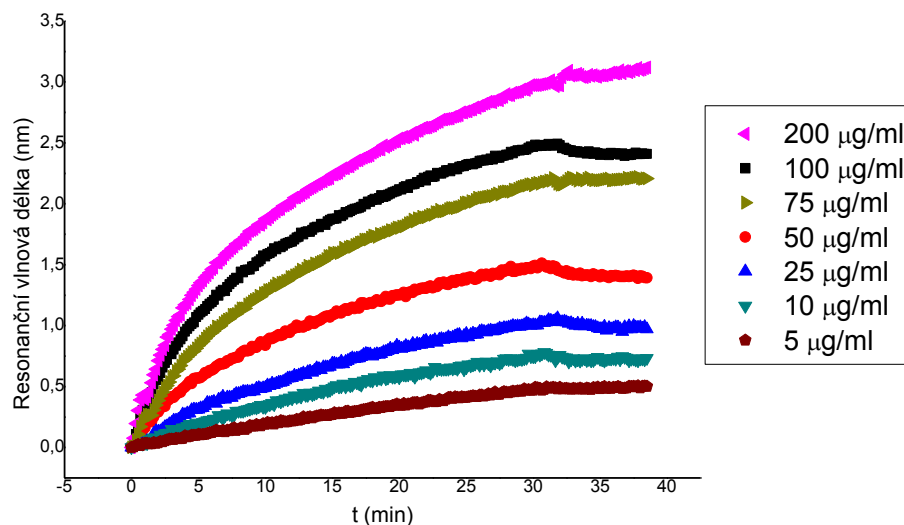


**Obr. 17:** Vliv heparinu na množství Fbg/Fb na povrchu čipu po působení roztoků ATIII s Fbg nebo ATIII s FBg a heparinem na Fbg/Fb vrstvu s navázaným trombinem. Množství Fbg a Fbg prokazováno protilátkou proti Fbg zobrazeno pomocí metody SPR.

#### 4.5 Kinetika interakce Fbg s fibrinovou sítí

Metodou rezonance povrchového plasmonu byla pozorována interakce fibrinogenu z roztoků o různých koncentracích na trombinem aktivovanou fibrinovou síť, která byla vytvořena na povrchu zlatého čipu. Časový průběh vazby fibrinogenu z roztoku na aktivovanou fibrinovou síť je exponenciální. Z vybraných křivek je možné na obr. 18 vidět závislost množství navázaného Fbg na Fb síť na koncentraci Fbg v roztoku, ze kterého se Fbg na povrch sítě vázal. Z roztoku o větší koncentraci Fbg se na Fb síť navázalo více Fbg než z roztoku, kde byla koncentrace Fbg nižší. Po 30 minutách, po dobu kterých probíhala asociace Fbg na povrch Fb sítě, byl k povrchu čipu přiváděn Tris pufr. Pokles křivky grafu naznačuje, že část Fbg, který se navázal po dobu zmíněných 30 minut na Fb síť, byla uvolněna do Tris pufru. V porovnání s množstvím navázaného Fbg je množství uvolněného Fbg ovšem podstatně menší. Fbg z roztoku byl navázán na aktivovanou Fb síť dostatečně pevně na to, aby jeho větší část zůstala navázána i po působení Tris pufru.





Obr. 18: Asociace fibrinogenu (z koncentrace 5 - 200 µg/ml) na aktivovanou fibrinovou síť a následná disociace části navázaného fibrinogenu do Tris pufru. Měřeno metodou rezonance povrchového plasmonu.

Asociace fibrinogenu na trombinem aktivovanou fibrinovou síť může být popsána rovnicí (1) [43]

$$R_t = (R_{eq} - R_0)[1 - \exp(-k_{on} \cdot t)] + R_0, \quad (1)$$

Kde  $R_t$  odpovídá SPR signálu v čase  $t$ ,  $R_0$  odpovídá SPR signálu v čase  $t = 0$ ,  $R_{eq}$  odpovídá maximální hodnotě signálu a  $k_{on}$  vyjadřuje míru rychlosti asociace určenou reakcí (2) [44].

$$k_{on} = k_{ass} \cdot [ligand] + k_{diss}, \quad (2)$$

ve které  $k_{ass}$  označuje rychlostní konstantu asociace ligandu, v našem případě fibrinogenu k fibrinové síti,  $k_{diss}$  označuje rychlostní konstantu disociace fibrinogenu z povrchu fibrinové sítě a  $[ligand]$  je molární koncentrace ligandu.

Rovnice (1) není dostatečně přesná vzhledem k dostupným experimentálním datům, proto je pro výpočet vhodnější použít rovnici s druhým exponenciálním členem – rovnice (3) [44]

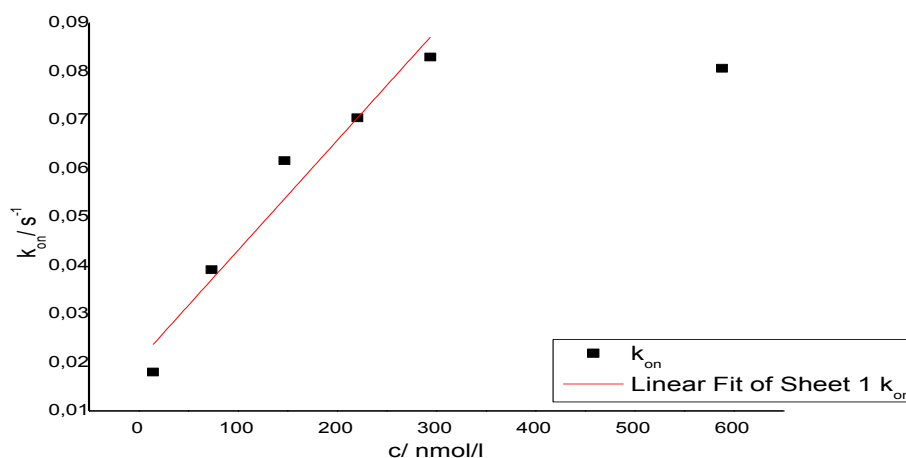
$$R_t = R_0 + R^1_{max}[1 - \exp(-k^1_{on} \cdot t)] + R^2_{max}[1 - \exp(-k^2_{on} \cdot t)] \quad (3)$$

Pro výpočet afinitní konstanty  $K_D$  pro interakci fibrinogenu s fibrinovou síť byla provedena série měření metodou rezonance povrchového plasmonu. Touto metodou byly zobrazeny grafy asociace fibrinogenu, z roztoků o různých koncentracích, na aktivovanou fibrinovou síť.

S použitím programu Origin byly jednotlivé takto získané SPR grafy proloženy exponenciální křivkou podle rovnice (1). Takto zjištěné hodnoty  $k_{on}$  pro každou koncentraci fibrinogenu byly použity pro sestrojení grafu závislosti  $k_{on}$  na koncentraci fibrinogenu. Počáteční, lineární, oblast byla proložena přímkou, která odpovídá rovnici (2). Z rovnice této přímky byly určeny hodnoty  $k_{ass}$  a  $k_{diss}$ , ze kterých byla, podle rovnice (4) vypočtena hodnota  $K_D$ .

$$K_D = k_{diss}/k_{ass} \quad (4)$$

Pro jednotlivé koncentrace roztoků Fbg, pro které byly sestrojeny grafy asociace Fbg na Fb síť, byly určeny hodnoty konstanty  $k_{on}$ , která charakterizuje míru této asociace. Určení  $k_{on}$  bylo provedeno podle rovnice (1). Obrázek 19 představuje závislost hodnot  $k_{on}$  na jednotlivých koncentracích Fbg v roztocích. První část grafu je lineární závislostí a odpovídá rovnici (2). Z rovnice této přímky byly určeny hodnoty  $k_{ass}$  a  $k_{diss}$ . Afinitní konstanta  $K_D$ , pro asociaci Fbg na aktivovanou Fb síť, vypočtena podle rovnice (4) má pro tyto série měření hodnotu  $8,98 \cdot 10^{-8}$  mol/l. Tato hodnota je v souladu s hodnotou získanou při měření inklokterakce kovalentně navázaného fibrinogenu na samoskladné vrstvě alkanthiolů [25].



**Obr. 19:** Závislost konstanty  $k_{on}$ , vyjadřující míru rychlosti asociace fibrinogenu z roztoku na připravenou fibrinovou síť, na koncentraci fibrinogenu v roztoku. Počáteční závislost má lineární charakter odpovídající rovnici  $k_{on} = k_{ass} \cdot [Fbg] + k_{diss}$ , kde  $k_{ass}$  je asociační,  $k_{diss}$  disociační konstanta a  $[Fbg]$  odpovídá koncentraci fibrinogenu v roztoku.

## 5 Závěr

Výsledky uvedené v práci odpovídají vytyčeným cílům a lze je shrnout následovně:

1. Bylo pozorováno postupné navazování trombinu z roztoku na fibrin(ogen)ovou vrstvu a jeho následné rychlé uvolňování do Tris pufru a roztoku fibrinogenu
2. Trombin navázaný na fibrinogenové vrstvě je v přítomnosti fibrinogenu, antitrombinu III a heparinu inhibován, což vede k postupnému zastavení růstu fibrinové sítě.
3. Mikroskopem atomárních sil byly zobrazeny sítě vzniknuté katalytickým účinkem povrchově vázaného trombinu na fibrin(ogen)ové vrstvě na fibrinogen v roztoku a byl porovnán vliv inhibitorů na růst těchto sítí. Podařilo se zobrazit také žebrování fibrinových vláken.
4. Byla prokázána přítomnost fibrinogenu v plasmě účinkem aFbg, byly pozorovány interakce fibrinogenové monovrstvy navázané z depositu plasmy s fibrinogenem a trombinem a také vliv heparinu na vznik fibrinové sítě na povrchu. V přítomnosti jen antitrombinu III v podmínkách SPR přístroje fibrinová síť vzniká, zatímco přítomnost heparinu vzniku sítě v daných podmínkách zabrání.
5. Byla určena afinitní konstanta  $K_D$  pro interakci fibrinogenu v roztoku s fibrinovou sítí připravenou na povrchu, která odpovídá hodnotě této konstanty určené pro interakci fibrinogenu kovalentně vázaného na povrch s monomery fibrinu v roztoku

## Seznam použité literatury:

- [1] Wolberg, A. S.; Campbell R. A., Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis, Transfus. Apher. Sci. 38 (2008), 15–23.
- [2] Katz, S.; Gutfreund, K.; Shulman, S.; Ferry, J. D., The Conversion of Fibrinogen to Fibrin. X. Light Scattering Studies of Bovine Fibrinogen, J. Am. Chem. Soc. 4 (1952), 5706–5709.
- [3] Weisel, J.W., Fibrinogen and Fibrin. Advances in Protein Chemistry 70 (2005), 248–285
- [4] Wolberg, A.S., Thrombin generation and fibrin clot structure. Blood Reviews 21 (2007), 131–142.
- [5] Price, T.M.; Strong, D.D.; Rudee, M.L.; Doolittle, R.F., Shadow-cast electron microscopy of fibrinogen with antibody fragments bound to specific regions. Proc. Natl Acad. Sci. USA 78 (1981), 200–204.
- [6] Henschen, A.H.; McDonagh, J., Fibrinogen, fibrin and factor XIII. New Comprehensive Biochemistry 13 (1986), 171–241.
- [7] Henschen, A.; Lottspeich, F.; Kehl, M.; Southan, C., Covalent Structure of Fibrinogen, Annals New York Academy of Sciences 408 (1983), 28–43.
- [8] Fowler, W.; Erickson H., Trinodular structure of fibrinogen--confirmation by both shadowing and negative stain electron microscopy, J. Mol Biol. 134 (1979), 241–249 .
- [9] Meh, D.A.; Siebenlist, K.R.; Mosesson, M.W., Identification and Characterisation of the Thrombin Binding Sites on Fibrin. The Journal of Biological Chemistry. 271 (1996), 23121–23125.
- [10] Hoeprich P.D. Jr.; Doolittle R.F., Dimeric half-molecules of human fibrinogen are joined through disulfide bonds in an antiparallel orientation, Biochemistry 22 (1983), 2049–55.
- [11] Gorkun, O. V.; Veklich, Y. I.; Medved', L. V.; Henschen, A. H.; Weisel, J. W, Role of the .alpha.C domains in fibrin formation, Biochemistry 33 (1994), 6986–6997.
- [12] Doolittle, R. F.; Goldbaum, D. M.; Doolittle, L. R., Designation of sequences involved in the “coiled-coil” interdomainal connections in fibrinogen: Constructions of an atomic scale model J. Mol. Biol. 120 (1978), 311–325.
- [13] Medved L. et al., Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin., J Thromb Haemost. 7 (2009), 355–9.
- [14] Chung, D. W.; Davie, E. W., Gamma and gamma0chains of human fibrinogen are produced by alternative RNA splicing. Biochem. 23 (1984), 4232–4236.

- [15] Mosesson, M.W.; Finlayson, J.S.; Umfleet, R.A., Human Fibrinogen Heterogeneities, *The Journal of Biological Chemistry* 247 (1972), 5223-5227
- [16] Mosesson M.W.; Finlayson J.S.; Umfleet R.A., Human fibrinogen heterogeneities: III. Identification of  $\gamma$  chain variants, *J Biol Chem* 247 (1972), 5223–7.
- [17] Wolfenstein-Todel, C.; Mosesson, M.W., Human Plasma Fibrinogen heterogeneity: Evidence for an Extended Carboxyl-Terminal Sequence in a Normal  $\gamma$  Chain Variant ( $\gamma'$ ), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77 (1980), 5069-73.
- [18] Lovely, R.S.; Moaddel, M.; Farrell, D.H., Fibrinogen gamma' chain binds thrombin exosite II. *J Thromb Haemost.* 1 (2003), 124-31.
- [19] Weitz J.I.; Hudoba M.; Massel D.; Maraganore J.; Hirsh J., Clot-bound Thrombin Is Protected from Inhibition by Heparin-Antithrombin III but Is Susceptible to Inactivation by Antithrombin III-independent Inhibitors, *J Clin. Invest.* 86 (1990), 385–391.
- [20] Rodgers, G.M.; Shuman, M.A., Prothrombin is activated on vascular endothelial cells by factor Xa and calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983), 7001-7005.
- [21] Blombäck B., Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* 83 (1996), 1-75.
- [22] Sheehan J. P.; Sadler J. E., Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), 5518-5522.
- [23] Torbet J., Fibrin assembly after fibrinopeptide A release in model systems and human plasma studied with magnetic birefringence. *Biochem. J.* 244 (1987), 633-637.
- [24] Olexa, S. A.; Budzinski A. Z., Localization of a fibrin polymerization site. *J. Biol. Chem.* 258 (1981), 3544-3549.
- [25] Chtcheglova, L.A.; Vogel, M.; Gruber, H.J.; Dietler, G.; Haeberli, A., Kinetics of the Interaction of desAABB-Fibrin Monomer with Immobilized Fibrinogen. *Biopolymers* 83 (2006), 69–82.
- [26] Weisel, J.W., Fibrin assembly–lateral aggregation and the role of the 2 pairs of fibrinopeptides. *Biophys J.* 50 (1986), 1079-1093.
- [27] Weisel, J. W.; Veklich, Y.; Gorkun O., The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots, *J Mol Biol.* 232 (1993), 285-97.
- [28] Riedel, T., Tvorba biokompatibilních fibrinových sítí na povrchu, disertační práce VŠCHT Praha (2010).
- [29] Williams, R.C., Band Patterns Seen by Electron Microcopy in Ordered Arrays of Bovine

- and Human Fibrinogen and Fibrin after Negative Staining. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80 (1982), 1570-1573
- [30] Weisel J. W. et al., A model from electron microscopy for the molecular structure of fibrinogen and fibrin, *Nature* 22 (1981), 263-7.
- [31] Blombäck B.; Bark N., Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophys Chem.* 112 (2004), 147-151.
- [32] Baier R.E.; Dutton R.C., Initial events in interactions of blood with a foreign surface. *Journal of Biomedical Materials Research* 3 (1969), 191-206.
- [33] Dyr, J.E.; Tichý, I.; Jiroušková, M.; Tobiška, P.; Slavík, R.; Homola, J.; Brynda, E.; Houska, M.; Suttner, J., Molecular Arrangement of Adsorbed Fibrinogen Molecules Characterized by Specific Monoclonal antibodies and a Surface Plasmon Resonance Sensor. *Sens. Actuators B* 51 (1998), 268-272.
- [34] Riedel, T.; Suttner, J.; Brynda, E.; Houska, M.; Medved, L.; Dyr, J.E., Fibrinopeptides A and B Release in the Process of Surface Fibrin Formation, *Blood* 117 (2011), 1700-1706.
- [35] Kato A., The biologic and clinical spectrum of Glanzmann's Thrombasthenia: implications of integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  for its pathogenesis, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 26 (1997), 1-23.
- [36] Laurens, N.; Koolwijk, P.; De Maat, P.M., Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 4 (2006), 932–939.
- [37] Stegmann J.P.; Nerem R.M., Phenotype modulation in vascular tissue engineering using biochemical and mechanical stimulation, *Ann. Biomed. Eng.* 31 (2003), 391–402.
- [38] Riedel, T.; Brynda, E.; Dyr, J.E.; Houska, M., Controlled preparation of thin fibrin films immobilized at solid surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research A* 88 (2009), 437-447
- [39] Rubens F.D.; Weitz J.I.; Brash J.L.; Kinlough-Rathbone R.L., The effect of antithrombin III-independent thrombin inhibitors and heparin on fibrin accretion onto fibrin-coated polyethylene, *Thromb Haemost.* 69 (1993), 130-4.
- [40] Yermolenko, I. S. et al., High-Resolution Visualization of Fibrinogen Molecules and Fibrin Fibres with Atomic Force Microscopy, *Biomacromolecules* 12 (2011), 370-379.
- [41] Baier, R.E.; Dutton, R.C., Initial events in interactions of blood with a foreign surface, *J. Biomed. Mater. Res.* 3 (1969), 191 – 206.
- [42] Mushunje, A. et al., Heparin-induced substrate behavior of antithrombin Cambridge II, *Blood* 102 (2003), 4028 – 4034.

- [43] Cush, R.; Cronin, J. M.; Stewart, W. J.; Maule, C. H.; Molloy, J.; Goddard, N. J. *Biosens Bioelectron* 1993, 8, 347–354.
- [44] George, A. J. T.; French, R. R.; Glennie, M. J. *J Immunol Methods* 1995, 183, 51–63.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčvatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka